



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

**Cláudia Valente
Pereira**

**Infecções urinárias causadas por *Klebsiella* spp. em
ambulatório**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

**Cláudia Valente
Pereira**

Infecções urinárias causadas por *Klebsiella* spp. em ambulatório

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Mendo, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação do Doutor António Rodrigues, Médico Especialista em Patologia Clínica.

o júri

presidente

Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Tânia Isabel Sousa Caetano
Investigadora em Pós-Doutoramento do CESAM

Prof. Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dr. António de Bastos Marques Rodrigues
Médico Especialista em Patologia Clínica, Avelab, Aveiro

agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de algumas pessoas.

À Professora Doutora Sónia Mendo, orientadora, por todo o auxílio prestado na realização deste trabalho, e ainda pela disponibilidade, dedicação e empenho para comigo.

Ao Doutor António Rodrigues, co-orientador, pelos conhecimentos transmitidos, por toda a atenção e disponibilidade sempre presentes, e por todo o carinho demonstrado.

À minha família e todos aqueles que me são próximos, pelo apoio e carinho que tiveram comigo.

A todos um sincero obrigado!

palavras-chave

Infecções do tracto urinário, *Klebsiella* spp., Terapia antimicrobiana, Substâncias antimicrobianas, Resistência bacteriana.

resumo

As infecções do tracto urinário (ITU) são frequentes na comunidade e a maioria tem origem bacteriana. São o principal motivo de consulta médica, na qual, a escolha da terapia antimicrobiana continua a ser empírica. A resistência antimicrobiana está a generalizar-se entre uma diversidade de espécies bacterianas clinicamente significativas, deste modo, o Laboratório de Microbiologia tem um papel crítico na vigilância e controlo da resistência antimicrobiana.

Neste estudo determinou-se a frequência dos microrganismos causadores de ITU adquiridas em ambulatório, e a susceptibilidade de *Klebsiella* spp. aos antimicrobianos. Os dados obtidos provenieram de indivíduos com o exame bacteriológico de urina (urocultura) positivo, num período de seis meses (Junho a Novembro) do ano 2010, e foram recolhidos num laboratório de Aveiro.

Foram identificados 2057 exames de urocultura positiva. *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus mirabilis* foram as três principais bactérias responsáveis pelas ITU. O sexo feminino foi o mais afectado por este tipo de infecções (81,4%) com uma média de idade de 61 anos, enquanto a média de idade do sexo masculino foi de 67 anos. Em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos, verificou-se que a totalidade dos isolados de *Klebsiella* spp. recolhidos neste estudo apresentam resistência à amoxicilina e elevada frequência de resistência aos antibióticos Amoxicilina+Ácido Clavulânico (AMC) e Sulfametoxazol+Trimetoprim (SXT). Deste modo, supõe-se que o uso frequente e irracional destes fármacos no tratamento empírico das ITU contribuem para o aumento da resistência bacteriana.

Este estudo fornece dados para o conhecimento dos diferentes agentes etiológicos mais frequentes nas ITU adquiridas na comunidade do distrito de Aveiro, e disponibiliza informação sobre os padrões de resistência de *Klebsiella* spp., necessários para um tratamento empírico adequado.

keywords

Urinary tract infections, *Klebsiella spp.*, Antimicrobial therapy, Antimicrobial, Bacterial resistance.

abstract

Urinary tract infections (UTI) are common in the community and most have bacterial origin. They are the main reason for medical consultation, in which the choice of antimicrobial therapy remains empirical. Antimicrobial resistance is becoming widespread among a variety of clinically significance bacterial species, thus, the Microbiology Laboratory plays a critical role in surveillance and control of antimicrobial resistance.

In this study we determined the frequency of the microorganisms causing community acquired UTI, and the antimicrobial susceptibility of *Klebsiella spp.*. The data obtained from individuals with positive bacteriological exam of urine (urine culture) within six months (June to November) of 2010, and were collected in a laboratory of Aveiro.

We identified 2057 positive urine cultures. *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* and *Proteus mirabilis* were the three main bacteria responsible for UTI. The female was the most affected by these infections (81.4%) with a mean age of 61 years, while the average age of males was 67 years. Regarding antimicrobial susceptibility, it was found that all isolates of *Klebsiella spp.* collected in this study are resistant to amoxicillin and have high frequency of resistance to antibiotics Amoxicillin + Clavulanate (AMC) and Sulphamethoxazole+Trimethoprim (SXT).

Thus, it is assumed that the frequent and irrational use of these drugs in the empirical treatment of UTI contribute to increased bacterial resistance. This study supplies important data to the knowledge of the different etiologic agents most common community acquired UTI in the district of Aveiro, and provides information about resistance profiles of *Klebsiella spp.*, which are required in practice for adjusted empirical treatment.

ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO.....	1
1.	TRACTO URINÁRIO.....	3
2.	INFECCÕES URINÁRIAS.....	6
2.1.	Epidemiologia	7
2.2.	Etiologia	7
2.3.	Factores de risco.....	9
2.4.	Manifestações clínicas.....	10
2.5.	Diagnóstico laboratorial	11
2.6.	Tratamento e prevenção	12
3.	<i>Klebsiella</i> spp.	14
3.1.	Caracterização	14
3.2.	Patogenicidade	15
3.3.	Epidemiologia	18
3.4.	Diagnóstico.....	19
4.	TRATAMENTO ANTIMICROBIANO	22
4.1.	Antibióticos	22
4.2.	Resistência bacteriana	27
II.	OBJECTIVOS	34
III.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
1.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM.....	35
2.	PROCEDIMENTO LABORATORIAL.....	35
2.1.	Recolha de urina.....	35
2.2.	Observação microscópica do sedimento urinário.....	36
2.3.	Fixação e Coloração de Gram	37
2.4.	Urocultura.....	39
2.5.	Identificação dos isolados bacterianos	41
2.6.	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	45
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
1.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM.....	48

2. ETIOLOGIA.....	52
3. SUSCEPTIBILIDADE DE ESTIRPES DE <i>KLEBSIELLA</i> SPP. AOS ANTIMICROBIANOS.....	54
V. CONCLUSÃO.....	59
VI. BIBLIOGRAFIA.....	60
ANEXO I.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do tracto urinário feminino (imagem à esquerda) e masculino (imagem à direita).....	3
Figura 2 – Representação de um rim (corte longitudinal) e um nefrónio.....	4
Figura 3 – Cultura de <i>Klebsiella</i> spp. em meio Gelose Sangue.	15
Figura 4 – Representação esquemática dos factores de patogenicidade de <i>Klebsiella</i> spp..	15
Figura 5 – Principais alvos de acção dos antibióticos.	22
Figura 6 – Mecanismo de acção dos β -lactâmicos..	23
Figura 7 - Esquema da biossíntese do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfonamidas e trimetoprim.	25
Figura 8 - Mecanismos bioquímicos de resistência aos antimicrobianos.....	29
Figura 9 - Representação esquemática dos diferentes mecanismos de troca genética entre bactérias: A- Transformação, B- Transdução e C- Conjugação.	30
Figura 10 - Plasmídeos observados em microscopia electrónica.	31
Figura 11 - Representação esquemática do mecanismo de transposição.	32
Figura 12 - Captura de genes através de um integrão.....	33
Figura 13 – Microfotografias de bactérias Gram positivas (A) e Gram negativas (B), e representação esquemática da composição química da parede celular das respectivas bactérias.....	38
Figura 14 – Fotografia de uma cultura de <i>Klebsiella</i> spp. em meio de cultura CLED.....	39
Figura 15 – Fotografia de culturas de <i>Klebsiella</i> spp. em meio de cultura Levine.	40
Figura 16 – Meios de cultura utilizados nas provas bioquímicas de identificação de <i>Klebsiella</i> spp..	45
Figura 17 – Fotografia de uma placa do teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	47
Figura 18 – Distribuição do número de exames bacteriológicos de urina realizados ao longo de seis meses.	48
Figura 19 – Resultados dos exames bacteriológicos de urina.	49
Figura 20 – Distribuição dos resultados dos exames bacteriológicos de urina ao longo de seis meses.	49
Figura 21– Distribuição do número de indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino, nos quais o exame bacteriológico foi positivo.....	50

Figura 22 – Distribuição do número de uroculturas positivas por classe etária e por sexo do utente.	51
Figura 23– Distribuição dos agentes etiológicos responsáveis pelas infecções urinárias. ..	52
Figura 24– Distribuição das infecções urinárias por agente etiológico e por sexo.	53
Figura 25 – Perfil de resistência de estirpes de <i>Klebsiella</i> spp. a determinados antimicrobianos.	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características bioquímicas de quatro espécies de *Klebsiella* spp.. 21

Tabela 2 – Antimicrobianos testados para as estirpes de *Klebsiella* spp..... 46

ABREVIATURAS

AMC – Amoxicilina+Ácido clavulânico

CLED – Cystine Lactose Electrolyte Deficient

CMI - Concentração Mínima Inibitória

ESBL - β -lactamases de amplo espectro

H₂S – Sulfureto de hidrogénio

ITU – Infecção do Tracto Urinário

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards

ONPG – Orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

PABA – Ácido para-aminobenzóico

SIM – Sulfite Indol Motility

SXT – Sulfametoxazol+Trimetoprim

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

I. INTRODUÇÃO

As infecções do tracto urinário (ITU) são muito frequentes tanto em meio hospitalar como em ambulatório. A maioria das mulheres tem alguma infecção urinária no decurso da sua vida, que por vezes se torna recorrente. A causa mais comum das ITU tem origem bacteriana, pelo que, o seu tratamento adequado requer a identificação da bactéria responsável pela infecção e o conhecimento do perfil de sensibilidade e resistência às substâncias antimicrobianas (GIL *et al.*, 1996).

O tratamento empírico das ITU não complicadas é uma prática habitual em ambulatório, pois de acordo com alguns estudos, a relação custo-eficácia indica que é favorável tratar os pacientes sintomáticos com diagnóstico de ITU não complicada, sem proceder à cultura da urina. No entanto, a crescente oferta de substâncias antimicrobianas conduz a alterações nos padrões de tratamento, condicionando a possível existência de novas resistências (GIL *et al.*, 1996).

Os microrganismos estão dotados de mecanismos adaptativos fortemente eficazes para enfrentar a acção dos fármacos, o que dificulta a escolha da substância antimicrobiana mais adequada para os erradicar (MACLEAN *et al.*, 2010).

O uso generalizado de substâncias antimicrobianas melhorou consideravelmente a saúde pública nos últimos 60 anos. Entretanto, a eficácia do tratamento está a diminuir rapidamente, como resultado da expansão contínua da resistência às substâncias antimicrobianas em populações de microrganismos. A evolução da resistência antimicrobiana é um exemplo de adaptação por seleção natural, pelo que, os investigadores tentam compreender e combater a propagação da resistência baseando-se em princípios evolutivos (MACLEAN *et al.*, 2010).

A emergência de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos tornou-se uma ameaça à saúde pública mundial. As infecções provocadas por este tipo de bactérias, estão associadas com taxas de mortalidade elevadas, maior permanência hospitalar e aumento dos custos, comparadas com as infecções causadas por bactérias sensíveis às substâncias antimicrobianas (D'AGATA *et al.*, 2008).

A disseminação de genes de resistência a antimicrobianos são o resultado de uma má e excessiva administração destes antimicrobianos, combinada com a capacidade das

bactérias para transferir esses genes e da existência de locais mais susceptíveis para a sua ocorrência, como por exemplo, os hospitais (D'AGATA *et al.*, 2008).

1. TRACTO URINÁRIO

O aparelho urinário (Figura 1) é constituído por dois rins, dois ureteres (canais unidos aos rins e à bexiga), pela bexiga e pela uretra (canal ligado à bexiga que transporta a urina para o exterior do corpo). Nos homens a uretra prolonga-se a todo o comprimento do pénis e nas mulheres termina mesmo em frente da abertura da vagina. Cada rim produz urina constantemente, a qual é drenada pelos ureteres para a bexiga a uma baixa pressão, que posteriormente sai pela uretra para o exterior do corpo através da vulva, nas mulheres, ou do pénis, nos homens. Em circunstâncias normais, a urina não contém bactérias nem outros microrganismos infecciosos (SHARP e DOHME, 2008).

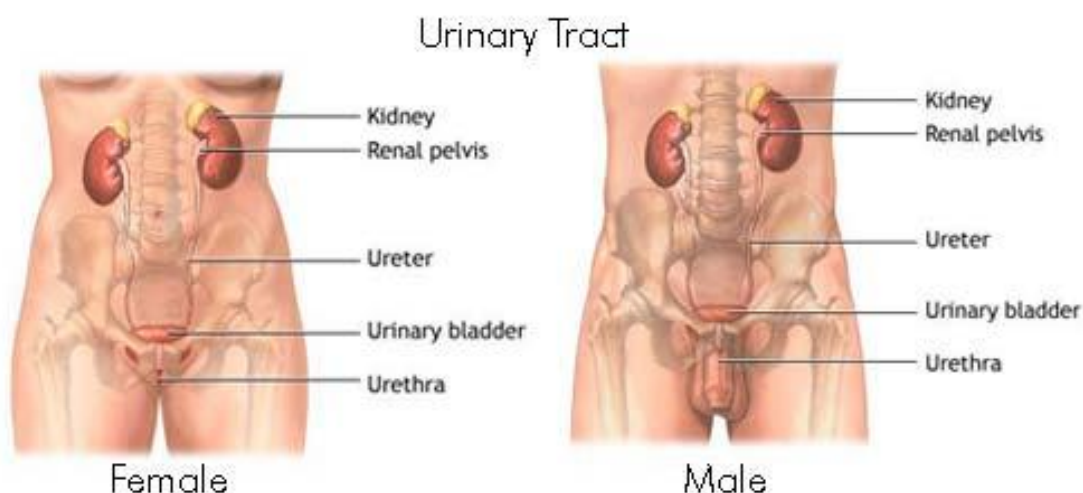
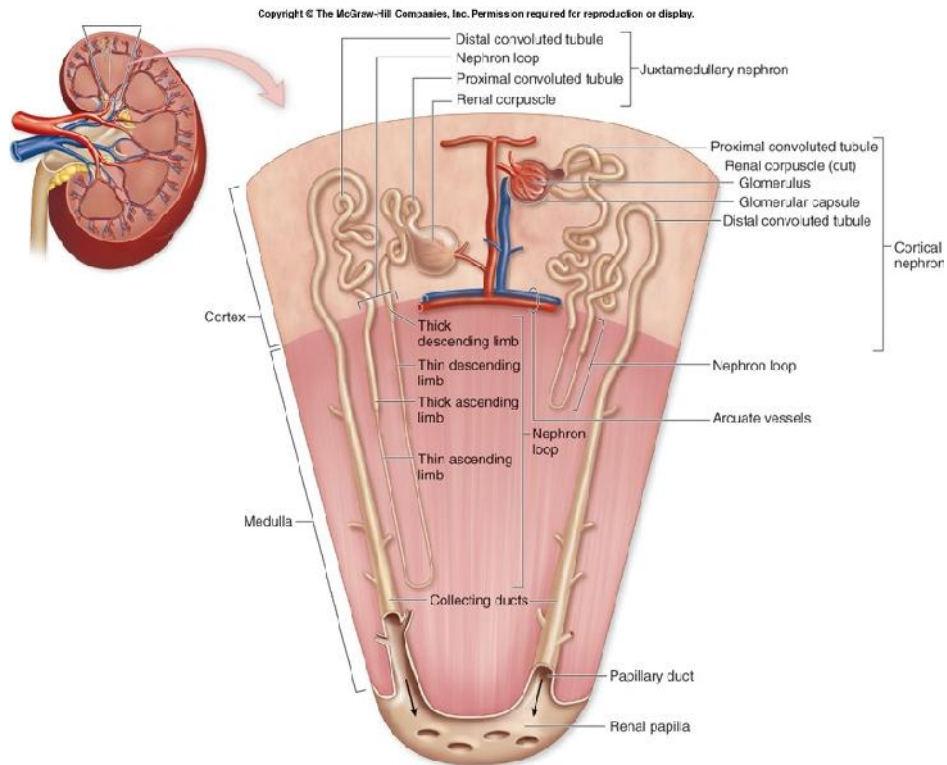


Figura 1 – Representação do tracto urinário feminino (imagem à esquerda) e masculino (imagem à direita). Adaptado de: ZIEVE e VORVICK (2010).



O sistema urinário integra um conjunto de funções:

- Filtração e excreção de resíduos;
- Regulação do pH do sangue;
- Regulação da pressão sanguínea;
- Osmoregulação;
- Regulação do volume e da composição do sangue;
- Outras funções homeostáticas (WALKER, 2002).

As principais funções do rins são a filtração do sangue e a excreção dos produtos metabólicos de resíduos e do excesso de água e de electrólitos, assim como de alguns fármacos. Durante este processo, o sangue entra no glomérulo com uma pressão elevada, a fracção líquida do sangue é filtrada através da membrana para a cápsula de Bowman. De seguida, passa para o tubo contornado proximal onde a maior parte do sódio, água, glicose e outras substâncias são absorvidas e, posteriormente reabsorvidas pelo sangue. Apenas as substâncias não necessárias ao corpo e o excesso de água são conduzidos ao tubo colector, onde o líquido é convertido em urina. Algumas hormonas ajudam a regular a função renal e a controlar a composição urinária, para manter o equilíbrio entre a água e os electrólitos (SHARP e DOHME, 2008).

Outra função importante dos rins é regular a pressão arterial, através da secreção do excesso de sódio e da produção de renina para activação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Também, através da secreção de eritropoietina, os rins estimulam a produção de eritrócitos na medula óssea. Estes, intervêm ainda no crescimento e manutenção dos ossos, na medida que ajudam a regular as concentrações de cálcio e fósforo, minerais fundamentais para o bom funcionamento dos ossos (SHARP e DOHME, 2008).

2. INFECÇÕES URINÁRIAS

Nas pessoas saudáveis, a bexiga contém urina estéril, ou seja, não possui nenhuma bactéria nem qualquer outro organismo infeccioso. Os mecanismos que mantêm a esterilidade da bexiga consistem, na existência da barreira fisiológica da uretra, no fluxo de urina, na competência da junção ureterovesical, na acção de enzimas e anticorpos, e nos efeitos antiaderentes mediados pelas células da mucosa da bexiga (SMELTZER e BARE, 2002). No entanto, qualquer parte das vias urinárias pode infectar-se.

A ITU corresponde à presença e multiplicação de microrganismos na urina, com possível invasão e reacção das estruturas tubulares ou parenquimatosas do aparelho urinário ou órgãos anexos (CORREIA *et al.*, 2007). Geralmente, as infecções das vias urinárias classificam-se de acordo com o local onde surgem. As ITU **inferiores** incluem a cistite (inflamação da bexiga), prostatite (inflamação da próstata) e uretrite (inflamação da uretra). As ITU **superiores** são menos comuns e englobam a pielonefrite aguda ou crónica, nefrite intersticial, abscessos renais, e também a ureterite (infecção dos ureteres).

O paciente está sujeito a diversas condições que podem influenciar na recorrência e duração da ITU, assim, estas podem ser adicionalmente classificadas como **não complicadas** e **complicadas**. Grande parte das ITU não complicadas são adquiridas na comunidade e ocorrem nas mulheres jovens (SMELTZER e BARE, 2002), enquanto a presença de diabetes, condições imunocomprometidas, obstrução do tracto urinário, ou microrganismos pouco comuns (ex.: *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma* spp.) em mulheres com ITU categoriza a infecção como complicada (MILLER e TANG, 2004).

Os microrganismos que infectam o tracto urinário seguem três vias:

- Ascendente, através da flora fecal e uretral. A porta de entrada mais frequente é o extremo inferior das vias urinárias, ou seja, a abertura da uretra na extremidade do pénis, nos homens, ou a vulva, nas mulheres (SHARP e DOHME, 2008);
- Hematogénea, sendo que os microorganismos contaminam o sangue e posteriormente o aparelho urinário;

- Linfática, que é uma via duvidosa da disseminação da infecção urinária, podendo atingir um nível crónico (CORREIA *et al.*, 2007).

2.1. Epidemiologia

A ITU é a segunda infecção mais comum na comunidade, a seguir às infecções respiratórias (CORREIA *et al.*, 2007), atingindo cerca de 150 milhões de pessoas em todo mundo (AKRAM *et al.*, 2007), pelo que, torna-se numa das principais razões para os pacientes procurarem cuidados médicos.

Relativamente a Portugal, a informação é escassa, pelo que exige uma avaliação dos estudos realizados noutros países. As infecções urinárias de origem bacteriana são as mais comuns nos EUA, e são responsáveis por cerca de cem mil hospitalizações por ano. São também a causa mais comum de infecções nosocomiais (35%) e, a segunda maior causa de bacteremia em doentes hospitalizados (MENDO *et al.*, 2008).

As ITU são mais frequentes em mulheres, sendo que 1 em cada 5 mulheres nos EUA desenvolve uma ITU durante algum período da sua vida (SMELTZER e BARE, 2002). Das mulheres com idades entre os 20 e 40 anos, 25% a 35% tiveram uma ITU (MILLER e TANG, 2004). Em ambiente hospitalar, este tipo de infecções contribui com mais de 40% do total comunicado pelos hospitais e afectando 60 mil pacientes por ano (SMELTZER e BARE, 2002).

2.2. Etiologia

O tracto urinário pode ser invadido por uma grande diversidade de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e parasitas, que variam em termos temporais, localização geográfica e idade dos pacientes (MASHOUF *et al.*, 2009).

A ITU é uma infecção bacteriana comum no âmbito comunitário, e os principais agentes causadores descritos são bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae*,

nomeadamente, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., bem como *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. (MENDO *et al.*, 2008).

As bactérias provenientes dos intestinos ou da vagina são maioritariamente responsáveis por 85% das infecções urinárias. No entanto, por norma, quando penetram nas vias urinárias, são expulsas pelo efeito de jacto da bexiga ao esvaziar-se (SHARP e DOHME, 2008).

Escherichia coli é o microrganismo mais comum, responsável por aproximadamente 80% das ITU não complicadas. A infecção urinária causada por outros microorganismos que não *Escherichia coli*, é mais comum nos pacientes com ITU complicadas, entre 44% e 72% (TABIBIAN *et al.*, 2008).

O vírus do herpes simples 2 pode infectar o pénis nos homens e consequentemente, na mulher, afectar a vulva, o períneo, as nádegas, o colo do útero ou a vagina. Se a uretra for afectada, a micção pode ser dolorosa e dificultar-se o esvaziamento da bexiga (SHARP e DOHME, 2008).

As infecções por fungos são provocadas principalmente por *Candida* spp., originando a candidíase, e são mais frequentes em pacientes com uma sonda vesical. Contudo, *Blastomyces* spp., que provoca a blastomicose, e *Coccidioides* spp., que provoca a coccidioidomicose, podem também infectar as vias urinárias (SHARP e DOHME, 2008).

Os parasitas associados a determinadas doenças são também agentes causadores de ITU. Assim, no paludismo, os protozoários transportados pelos mosquitos podem causar a hemólise e a obstrução dos vasos sanguíneos nos rins conduzindo a uma insuficiência renal aguda. A tricomoníase, doença sexualmente transmissível, conduzida por um protozoário, induz a um corrimento espumoso de cor amarelo-esverdeada que é expulso pela vagina. A esquistosomíase provocada por vermes causa infecções persistentes da bexiga e possivelmente termina em cancro, e é uma causa frequente de insuficiência renal grave nas pessoas que vivem no Egipto e no Brasil. A filaríase, cujo agente é um parasita intestinal, provoca a obstrução dos vasos linfáticos e posteriormente a presença de linfa na urina (SHARP e DOHME, 2008).

2.3. *Factores de risco*

A prevenção das infecções por microrganismos da família *Enterobacteriaceae* é difícil, pois estes microrganismos fazem parte da população microbiana endógena. Alguns factores de risco associados às infecções devem ser evitados, nomeadamente o uso irrestrito de antibióticos, que podem seleccionar bactérias resistentes, e procedimentos que traumatizam as barreiras mucosas (MENEZES *et al.*, 2005).

Existem diversos factores que se consideram predisponentes à ocorrência de infecções urinárias, nomeadamente:

- Incapacidade em esvaziar por completo a bexiga, associada, por exemplo, a condições como a gestação, distúrbios neurológicos, Gota;
- Fluxo urinário obstruído, possivelmente por anomalias congénitas (estenoses uretrais, contractura do colo da bexiga, tumores vesicais, cálculos nos ureteres ou nos rins, compressão dos ureteres e anormalidades neurológicas);
- Defesas naturais diminuídas ou imunossupressão;
- Instrumentação do tracto urinário (cateterismo, procedimentos cistoscópicos);
- Inflamação ou abrasão da mucosa uretral;
- Diabetes (SMELTZER e BARE, 2002);
- Hábitos de higiene inadequados;
- Inserção de objectos estranhos;
- Doenças sexualmente transmissíveis.

A ITU é extremamente frequente em todas as idades, desde a neonatal até à idosa. As mulheres têm maior prevalência de ITU, principalmente devido a factores fisiológicos, como a maior proximidade da uretra com o ânus e o facto de esta ser muito curta comparativamente à uretra masculina. Durante a infância e principalmente na fase escolar têm maior susceptibilidade do que os homens. Na vida adulta, o auge de ITU é maior devido à actividade sexual, gestação e menopausa. O sexo masculino tem maior incidência nos primeiros meses de vida, devido a um maior número de malformações congénitas, e na

fase adulta, sobretudo devido a problemas ao nível da próstata, do cálculo vesicular, de cateterismo e com a diabetes (MENDO *et al.*, 2008).

2.4. *Manifestações clínicas*

As ITU estão associadas a um conjunto de sinais e sintomas, cuja intensidade e prevalência poderão variar entre os indivíduos, contudo, estas podem também apresentarem-se assintomáticas.

De acordo com a sua localização apresentam diferentes sintomas. Assim, as ITU inferiores incluem, por norma, dor e ardor frequente na micção, polaciúria, nictúria, incontinência e dor suprapúbica ou pélvica, e também, poderá ocorrer hematúria e dor costovertebral. Por outro lado, as ITU superiores associam-se a febre, calafrios, dor no flanco ou lombar, náuseas e vômitos, cefaleias, indisposição e micção dolorosa (SMELTZER e BARE, 2002).

As ITU complicadas, em pacientes com catéteres, podem apresentarem-se assintomáticas ou mesmo provocar uma sepsis, pois estas são causadas por microrganismos com um vasto espectro de acção, com uma menor taxa de tratamento e com possibilidade de se reincidirem (SMELTZER e BARE, 2002).

As crianças apresentam sintomas menos específicos, como falta de apetite, perda de peso e paragem de crescimento (SMELTZER e BARE, 2002).

2.5. *Diagnóstico laboratorial*

O diagnóstico laboratorial tem como objectivo identificar os agentes bacterianos responsáveis pelas ITU, e realiza-se em diferentes fases. Inicialmente, é avaliado o aspecto da amostra de urina, de seguida efectua-se uma análise físico-química, posteriormente observa-se ao microscópio o sedimento, procede-se à cultura da urina no meio de crescimento adequado, e, após identificação do agente, é realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA).

A colheita de urina deve ser efectuada de forma asséptica. No caso de crianças nos primeiros anos de vida, a colheita pode ser efectuada através de um saco colector, com o inconveniente de estar sujeita a contaminações, ou através da punção supra-vesical; e no caso de doentes algaliados deve colher-se por picada da cânula da algália, após uma sobrecarga hídrica. Nos restantes casos, é efectuada a colheita do jacto médio.

A análise físico-química da urina compreende a avaliação da cor, do aspecto, da densidade, do pH, das proteínas, da glicose, da bilirrubina, dos corpos cetónicos, do urobilinogénio, dos nitritos, da hemoglobina e dos leucócitos. Na posterior observação ao microscópio, pesquisa-se e avalia-se a morfologia das células, a presença de eritrócitos e de leucócitos, bem como de cristais, cilindros e muco. Através da coloração de Gram, observa-se ao microscópio a eventual presença de bactérias.

Os pacientes com ITU possuem uma hematúria e uma piúria microscópica, no entanto, esta última não é específica da infecção bacteriana, podendo também estar associada a outras situações clínicas (SMELTZER e BARE, 2002).

A urocultura indica a ocorrência de multiplicação bacteriana no tracto urinário, permite o isolamento do agente etiológico e o estudo da sua susceptibilidade aos antimicrobianos (COSTA *et al.*, 2009). Apesar de bastante preciso, apresenta desvantagens relativamente à demora na obtenção do resultado e no elevado custo (PIRES *et al.*, 2007).

A urocultura consiste na sementeira da urina, a fim de se pesquisar a existência de bactérias e/ou fungos. Esta, é considerada positiva quando o número de bactérias é igual ou superior a 10^5 unidades formadoras de colónias por mililitro de urina (100000 UFC/mL) (MENDO *et al.*, 2008). Quando não se observa o crescimento de bactérias, esta é considerada negativa (ausência de bactérias no tracto urinário). Em contrapartida, quando a

cultura apresentar três ou mais estirpes é considerada contaminação, e recomenda-se nova colheita de urina.

2.6. Tratamento e prevenção

O tratamento das ITU envolve regularmente uma terapia medicamentosa e a educação do paciente.

Em pacientes com sintomas clínicos de ITU, o tratamento com antimicrobianos é normalmente iniciado empiricamente, antes do resultado do exame bacteriológico estar disponível (PRAIS *et al.*, 2003).

Uma vez que existem variáveis temporais e locais, a escolha do antimicrobiano deve ser específica para cada tipo de microrganismo infectante, após a realização do TSA, visando assim uma correcta terapêutica antimicrobiana. Deste modo, o objectivo é erradicar de maneira eficaz as bactérias que estão a causar a infecção urinária, minimizando os efeitos sobre as floras fecal e vaginal (SMELTZER e BARE, 2002). Por outro lado, as variáveis a serem consideradas na escolha do antimicrobiano são a eficácia, os efeitos adversos, custo e potencial para uma resistência futura (NICOLLE *et al.*, 2006), pelo que, de primeira escolha deverá ser um eficaz e de menor espectro de actividade (COSTA *et al.*, 2009).

Por norma, o tratamento das ITU não complicadas com antimicrobianos tem uma duração de dez a doze dias de tratamento, com 80% dos casos a serem curados (SMELTZER e BARE, 2002).

Os agentes de primeira escolha no tratamento empírico (de acordo com os sintomas clínicos) são o sulfametoxazol-trimetoprim (SXT), nitrofurantoína e fluorquinolonas. O SXT é um agente bacteriostático de espectro alargado; a nitrofurantoína tem um elevado nível de eficácia, mas provoca alguns efeitos adversos; e as fluorquinolonas têm um amplo espectro de acção, inclusive, no tratamento de ITU complicadas (NICOLLE *et al.*, 2006). Contudo, de acordo com o estudo de Koch *et al.* (2008), o SXT e a nitrofurantoína apresentam altas taxas de resistência no combate de ITU, provavelmente devido ao seu uso frequente.

Quando a infecção reincide, significa que a fonte de bacteriúria pode ser o tracto urinário superior, ou que o tratamento inicial foi inadequado ou administrado por um período muito curto. Assim, a administração de agentes antimicrobianos por longo prazo diminuem o risco de reinfecção e adequam-se aos pacientes com infecções recorrentes (SMELTZER e BARE, 2002).

O padrão de susceptibilidade de uma bactéria a um antimicrobiano, é determinado pela resistência bacteriana, que pode ser intrínseca, transmitida geneticamente, ou adquirida, através da interacção antimicrobiano-bactéria. A vigilância da susceptibilidade antimicrobiana é fundamental, de forma a prevenir a resistência bacteriana, pois o uso persistente ou indiscriminado de determinado antimicrobiano pode, por pressão selectiva, conduzir à selecção de estirpes resistentes, e consequentemente a terapêutica falha (COSTA *et al.*, 2009).

Devido à prevalência das infecções urinárias na comunidade, é de extrema importância agir no sentido de as prevenir. Deste modo, é fundamental:

- Ter os devidos cuidados de higiene pessoal, ou seja, tomar banho de chuveiro evitando que as bactérias na água da banheira penetrem a uretra;
- Beber líquidos diariamente para eliminar as bactérias, e evitar beber café e refrigerantes;
- Realizar uma micção regular e frequente. Deve-se urinar a cada duas a três horas durante o dia e esvaziar por completo a bexiga, pois evita-se a distensão excessiva da bexiga e o comprometimento do aporte sanguíneo para a parede vesical;
- Aderir ao regime terapêutico, de acordo com o rigor prescrito pelo médico (SMELTZER e BARE, 2002).

3. *Klebsiella* spp.

As bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae* representam uma causa importante de ITU, abscessos abdominais, pneumonias nosocomiais e sepsis (PASTA, 2008).

Na prática clínica *Klebsiella* spp. é associada a pneumonia adquirida na comunidade e infecção urinária, e a sua propagação pode provocar sepsis. A grande maioria das infecções ocorrem a nível hospitalar e maioritariamente em indivíduos imunocomprometidos e com doenças graves.

3.1. Caracterização

O género *Klebsiella* (Figura 3) pertence à família *Klebsiellae*, e a sua denominação foi atribuída pelo Microbiologista alemão Edwin Klebs, no século XIX (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

Caracteriza-se por não ser móvel, tem forma de bastonete, é Gram negativa e possui uma cápsula proeminente constituída por polissacarídeos, evidenciada após coloração de Gram e que oferece resistência. A sua superfície celular normalmente expressa dois tipos de antígenos, o antígeno O (lipopolissacarídeo) e o antígeno K (polissacarídeo capsular), que contribuem para a sua patogenicidade. Existem cerca de 77 antígenos K e 8 antígenos O, cuja variabilidade estrutural, constitui a base para a classificação em diferentes serotipos (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

Inicialmente, o género *Klebsiella* era dividido em três principais espécies baseadas nas reacções bioquímicas, contudo, actualmente são conhecidas sete espécies semelhantes na homologia do DNA: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella terrigena*, e *Klebsiella ornithinolytica* (UMEH e BERKOWITZ, 2009).



Figura 3 – Cultura de *Klebsiella* spp. em meio Gelose Sangue.

3.2. *Patogenicidade*

A patogenicidade é a capacidade de uma bactéria causar a doença (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

A patogénese da *Klebsiella* spp. centra-se num grupo de cinco factores (Figura 4):

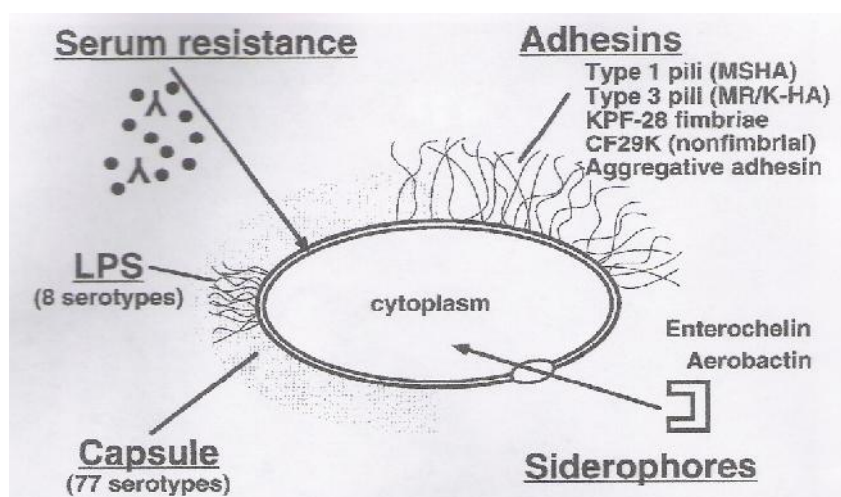


Figura 4 – Representação esquemática dos factores de patogenicidade de *Klebsiella* spp..

Adaptado de: PODSCHUN e ULLMANN (1998).

Antigénios capsulares

A cápsula composta por polissacarídeos complexos é o principal determinante da patogenicidade da *Klebsiella* spp.. Os seus constituintes formam espessas estruturas que cobrem a superfície das bactérias e que as protegem da fagocitose pelos granulócitos polimorfonucleares, e por outro lado, previnem a morte da bactéria através de factores séricos bactericidas (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Os diferentes tipos de antigénios capsulares expressos, permitem classificar 77 tipos serológicos deste microrganismo. Segundo alguns estudos, as estirpes que expressam os tipos K1 e K2 são consideradas particularmente susceptíveis de serem virulentas, enquanto os tipos K7 e K21 estão associados a uma baixa virulência. Várias pesquisas demonstraram também que, o serotipo K2 é o mais comum em isolados de pacientes com infecção urinária, pneumonia ou bacteriemia (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Fímbrias

O primeiro passo crítico no processo infeccioso é a aproximação do microrganismo às superfícies mucosas do hospedeiro. A propriedade de adesão é mediada por diferentes tipos de projecções filamentosas, as fímbrias, cada uma com a sua especificidade de receptor (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Resistência sérica e lipopolissacarídeos

O efeito bactericida do soro é uma forma de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, mediada por proteínas do complemento. Após a activação da cascata do complemento, as proteínas formam um complexo de ataque à membrana na superfície do microrganismo. A maioria das bactérias comensais são sensíveis ao efeito bactericida do soro, por outro lado, as estirpes patogénicas apresentam resistência.

O mecanismo exacto de resistência sérica não é conhecido, no entanto, surge a hipótese dos polissacarídeos da cápsula bacteriana poderem cobrir e mascarar as moléculas de lipopolissacarídeos subjacentes, exibindo uma estrutura de superfície disitinta que não é activada pelo complemento. A formação do complexo de ataque à membrana é inibido, impedindo assim, o dano da membrana e morte da célula bacteriana (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Sideróforos

No hospedeiro, o ferro encontra-se conjugado a proteínas, diminuindo a sua disponibilidade para o crescimento bacteriano. Por outro lado, no processo infeccioso há um efeito acentuado da oferta de ferro, pelo que, as bactérias suprimem-no através da secreção de quelantes de ferro, designados sideróforos (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

3.3. *Epidemiologia*

Klebsiella spp. é ubíqua na natureza, podendo ser encontrada em águas superficiais, no esgoto, no solo e em plantas, e por outro lado, nas superfícies mucosas dos mamíferos, nomeadamente dos seres humanos (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

A nível hospitalar, é facilmente transportada nas mãos, faringe e nas fezes. Infecciona preferencialmente o tracto urinário, o tracto respiratório inferior e o tracto biliar. As infecções nosocomiais representam 8% de todas as infecções hospitalares causadas por *Klebsiella* spp. (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

Relativamente às ITU adquiridas na comunidade, *Klebsiella* spp. é o segundo agente causador descrito (6-12%), sendo o principal *Escherichia coli* (53-72%) (MENDO *et al.*, 2008).

As espécies de *Klebsiella* são a segunda causa mais comum de septicemia. A sua incidência aumenta com a idade, atingindo maioritariamente os homens do que as mulheres (AL-HASAN *et al.*, 2010).

Ao nível pulmonar, estes microrganismos causam mudanças destrutivas, e afectam sobretudo homens de meia-idade e idosos com doenças debilitantes. *K. pneumoniae* é uma importante causa de pneumonia adquirida na comunidade a nível mundial (UMEH e BERKOWITZ, 2009), sendo a sua taxa de incidência superior a 50% (PODSCHUN, 1998).

A rinoscleroma e a ozena são outros dois tipos de infecções provocadas por *Klebsiella* spp.. A primeira diz respeito a um processo inflamatório crónico da nasofaringe, e a segunda, define-se como rinite crónica atrófica (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

3.4. *Diagnóstico*

Clínico

As infecções provocadas por *Klebsiella* spp. causam uma variedade de síndromes clínicas nomeadamente, infecções do tracto urinário, pneumonia, rinoscleroma e ozena (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

As infecções urinárias provocadas por *Klebsiella* spp. são clinicamente indistinguíveis das causadas por outros microrganismos, e caracterizam-se por frequência e dor na micção, dor e peso suprapúbico (MENDO *et al.*, 2008).

As pneumonias causadas por estas estirpes caracterizam-se por alterações destrutivas nos pulmões, que se iniciam rapidamente e que podem mesmo ser fatais (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

As infecções nosocomiais associadas a esta bactéria são as infecções urinárias, pneumonia, septicemia, colecistite, normalmente provocadas por dispositivos invasivos colocados em pacientes hospitalizados. Outras menos comuns incluem a colangite, meningite, endocardite e endoftalmite (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

As espécies *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* provocam ozena e rinoscleroma, respectivamente, associadas a infecções respiratórias do tracto superior. A ozena ocorre frequentemente em idosos e, caracteriza-se por congestão nasal e um cheiro nasal desagradável. A rinoscleroma inicia-se com corrimento nasal, formação de crostas e nódulos que podem levar à obstrução respiratória (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

Laboratorial

O diagnóstico de ITU só é confirmado pela urocultura, que indica a ocorrência de multiplicação bacteriana no tracto urinário, permite o isolamento do agente etiológico e o estudo da sua susceptibilidade aos antimicrobianos (COSTA *et al.*, 2009).

Klebsiella spp., é um microrganismo microaerofílico, ou seja, pode crescer em meios com concentração de oxigénio muito pequena. Utiliza o citrato e a glicose como fonte de carbono, fermenta a lactose, é urease positiva e indol negativa, por norma não produz sulfureto de hidrogénio e reage positivamente nos testes de Voges-Proskauer e Vermelho de Metilo (UMEH e BERKOWITZ, 2009). No meio SIM não apresenta mobilidade.

No meio de cultura Levine, as colónias apresentam-se cor de rosa e mucóides. Utilizam a lactose disponível no meio de cultura e produzem ácido como produto final, logo o pH do meio diminui, resultando na observação de colónias cor de rosa (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

No exame do Gram, e por observação microscópica, os bacilos Gram negativos apresentam-se curtos, gordos, envolvidos por uma cápsula que aparece como um espaço livre (UMEH e BERKOWITZ, 2009).

Das sete espécies existentes, quatro são clinicamente significativas: *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. pneumoniae* e *K. rhinoscleromatis*. Estas, podem ser distinguidas por alguns testes bioquímicos: indol, malonato, ONPG e Voges-Proskauer. *K. oxytoca* é distinguida pela reacção do indol positiva, *K. ozaenae* é negativa na reacção pelo malonato e Voges-Proskauer, *K. pneumoniae* é indol negativa mas malonato, ONPG e Voges-Proskauer positiva, *K. rhinoscleromatis* é indol e ONPG negativa (Tabela 1).

K. planticola foi a última espécie a ser reconhecida e é similar com *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, podendo ser distinguida destas pela sua habilidade para fermentar a glicose a 5°C (LENNETTE *et al.*, 1985).

Tabela 1 – Características bioquímicas de quatro espécies de *Klebsiella* spp..

Legenda: Positivo (+); Negativo (-).

Adaptado de: FERREIRA e SOUSA (1998); LENNETTE *et al.*(1985).

Comportamento bioquímico de quatro espécies do género <i>Klebsiella</i>				
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>
Mobilidade	-	-	-	-
Indol (produção)	-	+	-	-
Vermelho Metilo	-	-/+	+	+
Voges- Proskauer	+	+	-	+
Malonato (utilização)	+	+	-	+
Acetoína	+	+	-	-
Citrato Simmons	+	+	-	-
H₂S	-	-	-	-
Lactose (fermentação)	+	+	-/+	-
ONPG (β-galactosidase)	+	+	+	-
Urease	+	+	-/+	-
DNase	-	-	-	-

Para determinar a sensibilidade de uma estirpe bacteriana à acção dos antimicrobianos, realiza-se a cultura da bactéria em meio nutritivo (Muller-Hinton), ao qual se adiciona concentrações de substâncias antimicrobianas.

4. TRATAMENTO ANTIMICROBIANO

A era da antibioterapia iniciou-se em 1928, por Fleming, com a descoberta da penicilina, a partir da qual foram descobertos outros antibióticos. Contudo, a resistência bacteriana aos antibióticos é um facto, e foi descrita em 1940 por Abraham e Chain, após a descoberta de estirpes de *Staphylococcus aureus* produtoras de penicilinasas, enzimas que destroem as penicilinas (FERREIRA e SOUSA, 1998).

De acordo com os resultados do TSA, os antimicrobianos que são administradas geralmente contra os patogéneos causadores de ITU são o sulfametoxazol+trimetoprim, amoxicilina+ácido clavulânico, aminoglicosídeos, cefalosporinas e nitrofurantoína (MASHOUF *et al.*, 2009).

4.1. Antibióticos

Os antibióticos utilizados no combate das infecções bacterianas, podem matar as bactérias (acção bactericida), ou o seu efeito traduzir-se na inibição da multiplicação bacteriana (acção bacteriostática). Os principais alvos de acção dos antibióticos (Figura 5) nas bactérias são: a biossíntese da parede celular, a síntese proteica e a síntese dos ácidos nucleicos (FERREIRA e SOUSA, 1998).

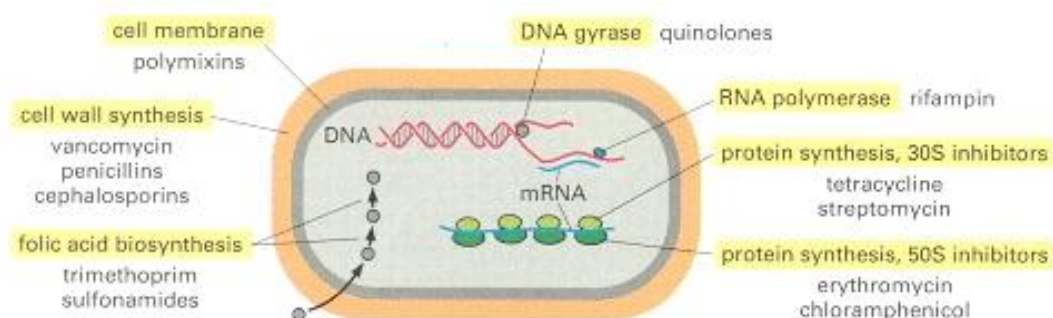


Figura 5 – Principais alvos de acção dos antibióticos. Adaptado de: ALBERTS *et al.* (2002).

- β -lactâmicos

O seu **mecanismo de acção** consiste na inibição da síntese do peptidoglicano, constituinte da parede celular bacteriana. Os antibióticos penetram na bactéria através de canais de porinas, ligam-se às PBPs (proteínas de ligação da penicilina) e inibem a transpeptidação, responsável pela ligação das cadeias peptídicas que formam o peptidoglicano da parede celular (Figura 6). Deste modo, o inibidor das enzimas autolíticas na parede celular é inactivado, ocorrendo a lise da bactéria (efeito bactericida) (RANG *et al.*, 2004). Deste grupo fazem parte as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemos.

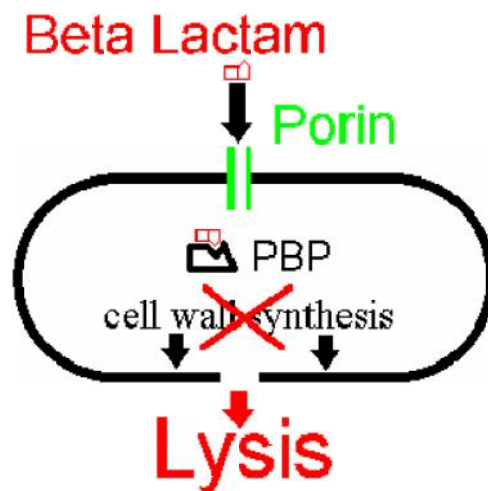


Figura 6 – Mecanismo de acção dos β -lactâmicos. Adaptado de: HOPLEY e SCHALKWYK (2011).

Os **mecanismos de resistência** pelos quais as bactérias escapam ao efeito bactericida deste grupo são:

- 1 – Redução na permeabilidade da membrana externa;
- 2 – Locais de ligação às PBPs alterados, e consequente dificuldade na ligação do anel β -lactâmico à proteína, diminuindo a sua actividade;
- 3 – Produção de β -lactamases (FERREIRA e SOUSA, 1998), enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico. É o principal factor de resistência das bactérias Gram negativas aos antimicrobianos β -lactâmicos (PASTA *et al.*, 2008).

- Aminoglicosídeos

O seu **mecanismo de acção** consiste na inibição da síntese proteica e tem um efeito bactericida (RANG *et al.*, 2004). Os aminoglicosídeos ligam-se à subunidade 30S dos ribossomas provocando uma leitura errada da mensagem codificada pelo RNA mensageiro, e induzem a produção de proteínas anómalas. A interacção deste tipo de proteínas com a membrana da bactéria, provoca uma alteração na sua permeabilidade e provoca um forte efluxo de iões potássio (FERREIRA e SOUSA, 1998).

A **resistência bacteriana** a estes antibióticos centra-se frequentemente na inactivação enzimática. Outros mecanismos de resistência são a alteração dos ribossomas por mutação dificultando a ligação das substâncias antimicrobianas, e a difusão reduzida das substâncias antimicrobianas (FERREIRA e SOUSA, 1998).

- Quinolonas

São compostos sintéticos que bloqueiam a acção da DNA girase e topoisomerase IV, responsáveis pelo processo de replicação do DNA (FERREIRA e SOUSA, 1998). Têm um amplo espectro de acção contra microrganismos Gram positivos e negativos, e uma excelente actividade contra as *Enterobacteriaceae*, bem como microrganismos resistentes às penicilinas, cafolosporinas e aminoglicosídeos (RANG *et al.*, 2004).

A **resistência** das bactérias à acção destes antibióticos é mediado por:

1. Alterações nas enzimas alvo, por mutações;
2. Alteração das porinas e, consequentemente, diminuição da permeabilidade da membrana externa, o que dificulta a sua difusão;
3. Efluxo do composto, por transporte activo (FERREIRA e SOUSA, 1998).

- Sulfonamidas e Trimetoprim

A combinação do sulfametoxazol com o trimetoprim (SXT) tem sido o antibiótico de escolha para o tratamento de ITU nos EUA e vários países europeus (RAZ *et al.*, 2000), que resulta numa actividade antimicrobiana de largo espectro. Têm uma **acção** bacteriostática e são inibidores da biossíntese de ácido fólico, indispensável na síntese de proteínas e ácidos nucleicos, não ocorrendo desta forma a divisão celular. As sulfonamidas têm uma estrutura análoga com o ácido para-aminobenzoico (PABA), pelo que, são inibidores competitivos da enzima dihidropteroato sintetase, impedindo a síntese de ácido dihidropteróico. O trimetoprim é um análogo estrutural da porção pteridina do ácido dihidropteróico, compete com a enzima dihidrofolato redutase e inibe a produção de ácido tetrahydrofólico (Figura 7). A **resistência** bacteriana ao SXT centra-se na alteração das enzimas alvo (FERREIRA e SOUSA, 1998).

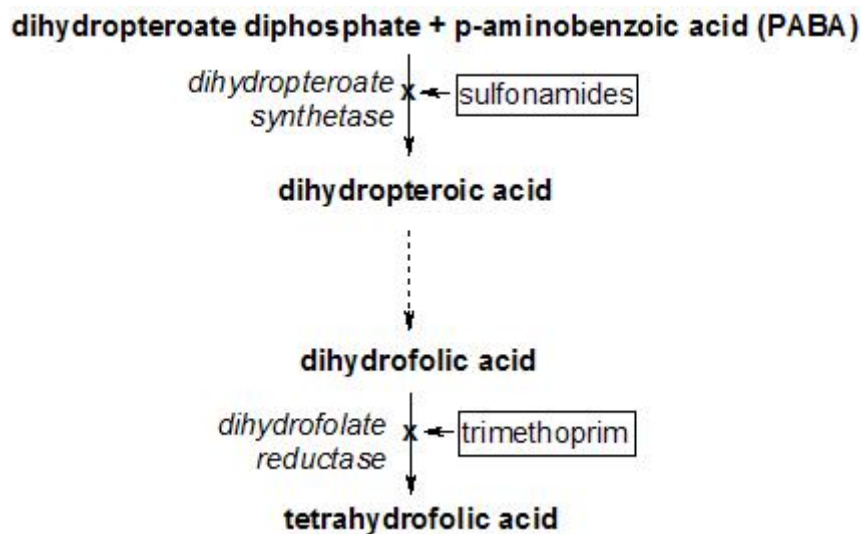


Figura 7 - Esquema da biossíntese do ácido fólico e locais de acção dos antibióticos sulfonamidas e trimetoprim. Adaptado de: WIKIPEDIA (2011).

- Nitrofurantoína

O seu mecanismo de acção exacto é desconhecido, no entanto, acredita-se que inibe várias enzimas bacterianas e danifica o DNA (MURRAY *et al.*, 1995). É um composto activo contra uma variedade de microrganismos Gram positivos e negativos, e em termos clínicos limita-se ao tratamento de ITU (RANG *et al.*, 2004). Este antibiótico é administrado oralmente e tem uma boa absorção no tracto gastrointestinal, contudo, os efeitos secundários mais comuns são irritação gastrointestinal, anorexia, náuseas e vómitos. As reacções pulmonares são os efeitos secundários mais perigosos e comumente associados ao seu uso. Em poucos dias de terapia pode ocorrer pneumonia aguda, mais frequente em pacientes idosos, e rapidamente reversível após a sua cessação. A contínua terapia com nitrofurantoína (seis meses ou mais), provoca reacções pulmonares crónicas, conduzindo em última instância a uma fibrose pulmonar irreversível (MURRAY *et al.*, 1995).

4.2. Resistência bacteriana

Nos últimos anos a prevalência da resistência bacteriana aos antibióticos utilizados no combate das infecções urinárias comunitárias tem aumentado, deste modo, o aumento de bactérias multiresistentes representa um desafio no tratamento deste tipo de infecções (MARTINS *et al.*, 2010).

Os microrganismos estão sujeitos a alterações genéticas que lhes permite uma melhor adaptação ao meio ambiente e que possibilitam o escape à acção dos antibióticos. Esta realidade, permite o crescimento selectivo de uma estirpe bacteriana e a sua sobrevivência (FERREIRA e SOUSA, 1998).

As bactérias possuem um conjunto de sistemas bioquímicos e genéticos que lhes garante a evolução e disseminação da resistência aos antibióticos (HAWKEY, 1998), desta forma, as opções disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas tornam-se restritas.

O padrão de susceptibilidade de uma bactéria a um determinado antibiótico, deve-se à existência de resistência bacteriana, que pode ser intrínseca (ou natural) ou adquirida (COSTA *et al.*, 2009).

No caso da **resistência intrínseca (ou natural)**, todas as bactérias da mesma espécie são resistentes a alguns grupos de antibióticos, permitindo-lhes ter vantagens competitivas em relação a outras espécies e sobreviver na presença desses antibióticos. É uma característica genética transmitida entre gerações, como é o caso da resistência do *Mycoplasma pneumoniae* a todos os β -lactâmicos (HAWKEY, 1998).

A **resistência adquirida** ocorre quando uma bactéria, que anteriormente era sensível a um determinado antibiótico, desenvolve resistência através de mutações ou por aquisição de genes de resistência (HAWKEY, 1998).

A resistência bacteriana causa um impacto económico, que afecta tanto o prescritor como o paciente que utiliza os antimicrobianos:

- **Prescritor:** tem o custo da ineficácia da terapia convencional, com eventual perda de pacientes;
- **Paciente:** tem o custo da doença não solucionada e de eventual morte; onera-se com a exigência de medicamento alternativo, usualmente mais caro;
- **Sistema público de saúde:** gasta excessivamente, desequilibrando recursos geralmente escassos;
- **Visão social:** há redução de fonte de saúde (infecções mais graves, menos fármacos eficazes) para a população;
- **Indústria farmacêutica:** estímulo para o desenvolvimento de novos produtos. É o único segmento que lucra (WANNMACHER, 2004).

Diferentes mecanismos podem estar associados ao escape das bactérias à acção dos antimicrobianos, bem como, podem conduzir à resistência antimicrobiana. As bactérias exibem quatro mecanismos de resistência principais (Figura 8).

Mecanismos de resistência

- (A) Receptores bacterianos com baixa afinidade para os antimicrobianos;
- (B) Permeabilidade reduzida e transporte activo dos antimicrobianos;
- (C) Enzimas produzidas pelas bactérias que inactivam ou modificam os antimicrobianos (por exemplo, as β -lactamases);
- (D) Vias metabólicas que substituem a reacção inibida pelos antimicrobianos (GARRETT *et al.*, 1997).

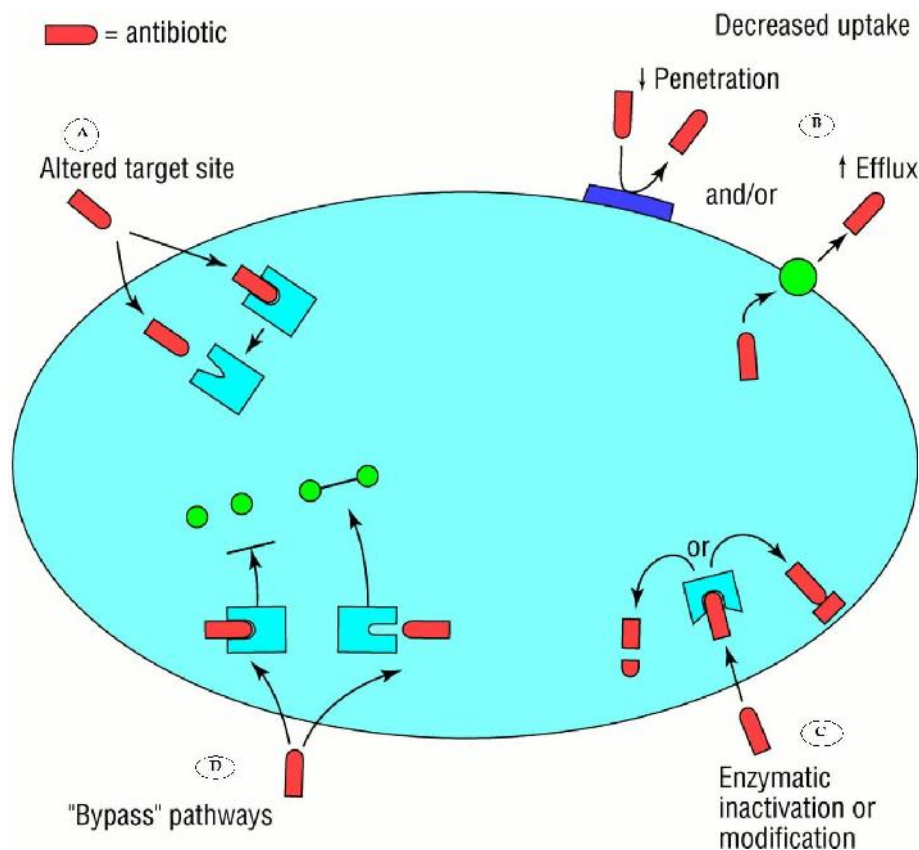


Figura 8 - Mecanismos bioquímicos de resistência aos antimicrobianos. Adaptado de: HAWKEY (1998).

Existem diversos mecanismos através dos quais as bactérias adquirem e transferem material genético, que contém informação responsável pela expressão de determinadas características, nomeadamente a resistência face a determinados antimicrobianos.

Transferência de genes de resistência entre bactérias

Os diferentes mecanismos de troca genética entre bactérias (Figura 9) são:

Transformação: consiste na incorporação de segmentos de DNA externo, por uma bactéria receptora disponível a introduzi-los no seu genoma.

Transdução: o DNA do plasmídeo é incorporado por um bacteriófago no decorrer de uma infecção celular. De seguida, o bacteriófago pode infectar uma nova célula e transferir o material genético.

Conjugação: através do contacto directo, por *pili* sexuais, entre uma bactéria dadora e uma bactéria receptora, ocorre a transferência de DNA cromossómico ou extracromossómico. Este é o principal mecanismo de disseminação da resistência (RANG *et al.*, 2004).

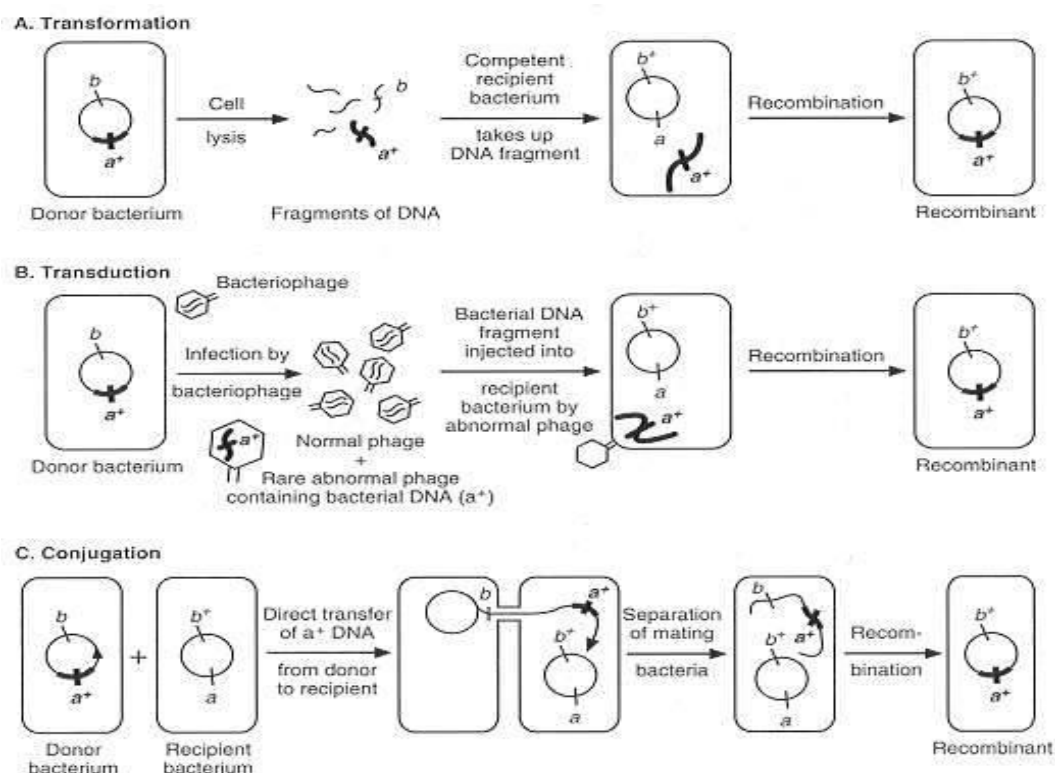


Figura 9 - Representação esquemática dos diferentes mecanismos de troca genética entre bactérias: A- Transformação, B- Transducção e C- Conjugação. Adaptado de: REINHARDT (2009).

Os elementos genéticos móveis, são segmentos de DNA que codificam enzimas e outras proteínas, e medeiam o movimento de DNA dentro dos genomas (movimento intracelular) ou entre bactérias (movimento intercelular), culminando na transferência de genes (FROST *et al.*, 2005). São eles:

Plasmídeos

Os plasmídeos (Figura 10) são elementos genéticos extracromossômicos, constituídos por um ou mais genes, com propriedade de autoreplicação. Têm a capacidade de transportar genes, conferindo novas funções às células bacterianas, nomeadamente genes que conferem resistência aos antimicrobianos, genes que codificam factores de virulência, genes que codificam enzimas envolvidas em processos de degradação de substratos (FERREIRA e SOUSA, 1998).



Figura 10 - Plasmídeos observados em microscopia electrónica. Adaptado de: REINHARDT (2009).

Transposões

Transposição: é um processo no qual ocorre movimento de segmentos de DNA (transposões) no genoma bacteriano, resultando em modificações na estrutura do DNA (FERREIRA e SOUSA, 1998). Os transposões podem ser integrados no DNA receptor independentemente do mecanismo de recombinação homóloga, e sofrer replicação (Figura 11) Estes, podem transportar um ou mais genes de resistência e serem inseridos nos plasmídeos ou no cromossoma, pelo que, provavelmente são responsáveis pela distribuição disseminada de genes de resistência (RANG *et al.*, 2004).

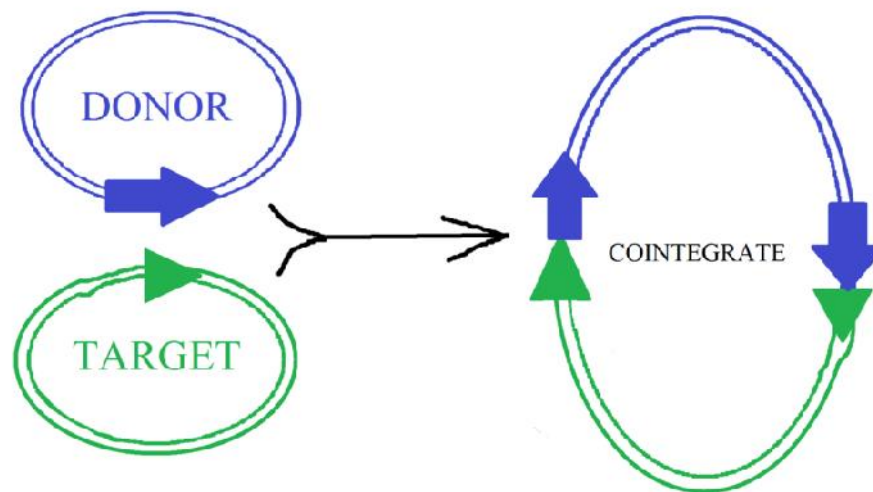


Figura 11 - Representação esquemática do mecanismo de transposição. Adaptado de: WIKIPEDIA (2011).

Integrões

São unidades de DNA móvel que contêm um gene da enzima integrase, responsável pela inserção de genes em sítios específicos. Podem estar inseridos em transposões e localizados tanto no cromossoma como em plasmídeos bacterianos (RANG *et al.*, 2004).

A figura 12 exemplifica o processo pelo qual a cassette de genes de resistência aos antibióticos (*attC*) é inserida no sítio específico (*attI*), através da enzima integrase, codificada pelo gene *intI1* (RELMAN *et al.*, 2009).

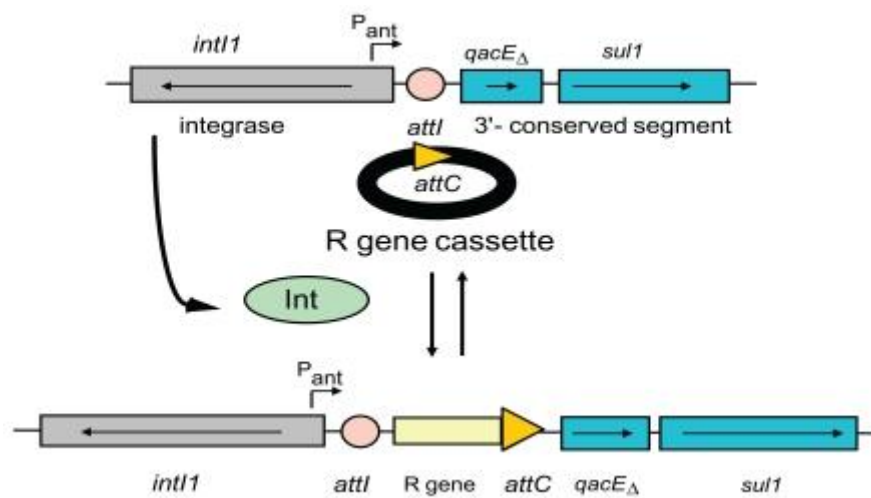


Figura 12 - Captura de genes através de um integrão. Adaptado de: RELMAN *et al.* (2009).

II. OBJECTIVOS

As infecções urinárias são uma das principais causas de doença em Portugal, que variam de acordo com a sua origem, hospitalar ou ambulatória (MENDO *et al.*, 2008). O conhecimento dos agentes etiológicos causadores de ITU e do seu perfil de resistência aos antimicrobianos é de extrema importância, nomeadamente no que diz respeito à administração empírica de substâncias antimicrobianas. O uso frequente das substâncias antimicrobianas é um dos factores responsáveis pelo surgimento de resistência antimicrobiana (KOCH *et al.*, 2008), dificultando as escolhas de tratamento.

Neste trabalho, foram seleccionadas estirpes de *Klebsiella* spp. causadoras de ITU adquiridas na comunidade, pelo facto de ter sido o segundo microrganismo mais prevalente, e porque, sendo a *Escherichia coli* o microrganismo causador de ITU mais frequente, são vastos os estudos a seu respeito.

Este estudo tem como objectivos fundamentais:

- Determinar quais os agentes etiológicos mais frequentes responsáveis pelas infecções urinárias, em amostras de urina asséptica, obtidas em meio ambulatório durante um semestre;
- Identificar o género e a faixa etária em que ocorrem o maior número de ITU adquiridas na comunidade;
- Avaliar o perfil de resistência das estirpes de *Klebsiella* spp. às substâncias antimicrobianas testadas, isoladas dos pacientes com infecções urinárias adquiridas na comunidade.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM

Neste estudo foram incluídos todos os exames bacteriológicos de urina asséptica que deram entrada no Serviço de Bacteriologia do Avelab - Laboratórios Médicos de Análises Clínicas, Aveiro, Portugal, oriundos do meio ambulatório, durante um período de seis meses, compreendido entre Junho e Novembro de 2010. Neste período foram realizadas 12886 uroculturas, das quais 2057 verificou-se serem positivas, e provenientes de pacientes com suspeita de ITU. Em todas as amostras positivas foi registado sistematicamente a idade, sexo e a identificação da(s) estirpe(s) bacteriana(s).

Dos isolados bacterianos obtidos, foram seleccionadas as estirpes de *Klebsiella* spp., provenientes de doentes com ITU adquiridas em ambulatório, para estudar o seu perfil de sensibilidade e resistência a determinadas substâncias antimicrobianas.

2. PROCEDIMENTO LABORATORIAL

2.1. Recolha de urina

A recolha de amostra para a análise da urina foi realizada pelo próprio utente, sendo crucial para obter um resultado adequado. O utente colheu a primeira urina da manhã, de forma asséptica, para um frasco esterilizado, e entregou num prazo máximo de 2 horas. Caso não tenha sido possível, a amostra foi guardada no frigorífico no máximo até 24 horas após a colheita (FONSECA *et al.*, 2004).

Diferentes métodos de colheita poderão ser realizados, dependendo do utente:

- Colheita do jacto médio – o utente lavou os órgãos genitais com água e sabão, no caso das mulheres da frente para trás, e no caso dos homens afastar o prepúcio e lavar a glande.

Iniciou a micção, desprezou o primeiro jacto e colheu o jacto intermédio para o frasco esterilizado;

- Punção de catéter urinário (paciente algaliado) – foi clampada a algália durante 10 a 15 minutos e desinfectada com álcool a 70° o local a puncionar. Recolheu-se directamente da algália para o frasco esterilizado. A colheita foi realizada aquando da substituição da algália;
- Punção supra-púbica (paciente com obstrução uretral) – o utente tinha a bexiga cheia. Desinfectou-se a região da punção com um anti-séptico. Puncionou-se e aspirou-se a urina com uma seringa esterilizada, e colocou-se num frasco esterilizado;
- Saco colector (criança) – lavou-se os genitais da criança com água e sabão, e secou-se com uma compressa esterilizada. Aplicou-se o saco colector esterilizado, no caso dos meninos, o pénis foi introduzido no saco e o autocolante colado na pele circundante, no caso das meninas, a abertura do saco foi colada na metade superior do genital. Após a criança urinar, o saco foi descolado e a urina foi transferida para um frasco esterilizado. Quando não foi feita urina ao fim de 30 minutos, retirou-se o saco e repetiu-se todo o processo com um novo saco de modo a evitar contaminações (FONSECA *et al.*, 2004).

2.2. Observação microscópica do sedimento urinário

Após a colheita, as amostras de urina seguem o processo de preparação do sedimento urinário e exame directo a fresco, para observação de elementos celulares como células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, fungos ou parasitas, cristais, cilindros. Este processo consiste num conjunto de etapas:

- 1 – Homogeneizar a urina e transferi-la, em zona de assépsia, para um tubo cónico de 10 mL devidamente identificado;
- 2 – Centrifugar a urina a 2500 rotações por minuto, durante 7 minutos;

- 3 – Decantar o sobrenadante e homogeneizar o sedimento;
- 4 – Usando uma Pipeta de Pasteur, colocar uma gota de cada sedimento em lâmina numerada e cobrir com lamela;
- 5 – Observar o sedimento ao microscópico, em ampliação de 400X. Fazer a quantificação de células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais.

2.3. Fixação e Coloração de Gram

Foi o primeiro passo na identificação das bactérias, realizado após observação de crescimento bacteriano em meios de cultura.

A coloração de Gram é uma técnica utilizada para observação ao microscópio óptico, que diferencia os microrganismos com base na composição química e integridade da sua parede celular. Consoante a cor que adquirem, os microrganismos são classificados em Gram positivos (cor roxa), e Gram negativos (cor rosa).

A parede celular das bactérias Gram positivas (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.) é constituída principalmente por uma camada de peptideoglicano, que actua como uma barreira impedindo a saída do corante Cristal Violeta e estas células ficam coradas de roxo. Em contrapartida, a parede celular das bactérias Gram negativas (família *Enterobacteriaceae*) tem uma camada fina de peptideoglicano que circunda a membrana plasmática, e um teor em lípidos. Assim, na etapa de descoloração, parte dos lípidos são dissolvidas, o primeiro corante é removido, e posteriormente as células são coradas com a Safranina, adquirindo a cor rosa (Figura 13).

A fixação e coloração de Gram seguem as seguintes etapas:

- 1 – Colocar uma gota de suspensão microbiana na lâmina e estender o esfregaço;
- 2 – Deixar secar e passar a lâmina à chama para fixar;
- 3 – Cobrir a lâmina com Cristal Violeta e deixar repousar durante 1 minuto;
- 4 – Lavar o excesso de corante com água corrente;

- 5 – Remover o excesso de água e cobrir com Solutio Lugol, deixando em contacto por 1 minuto;
- 6 – Lavar com água corrente;
- 7 – Descolorar com uma solução álcool-acetona (3:1) durante alguns segundos, até não ser arrastado mais corante;
- 8 – Lavar com água;
- 9 – Corar com Safranina durante 2 minutos;
- 10 – Lavar com água e deixar secar;
- 11 – Observar ao microscópico com a objectiva de imersão (1000X).

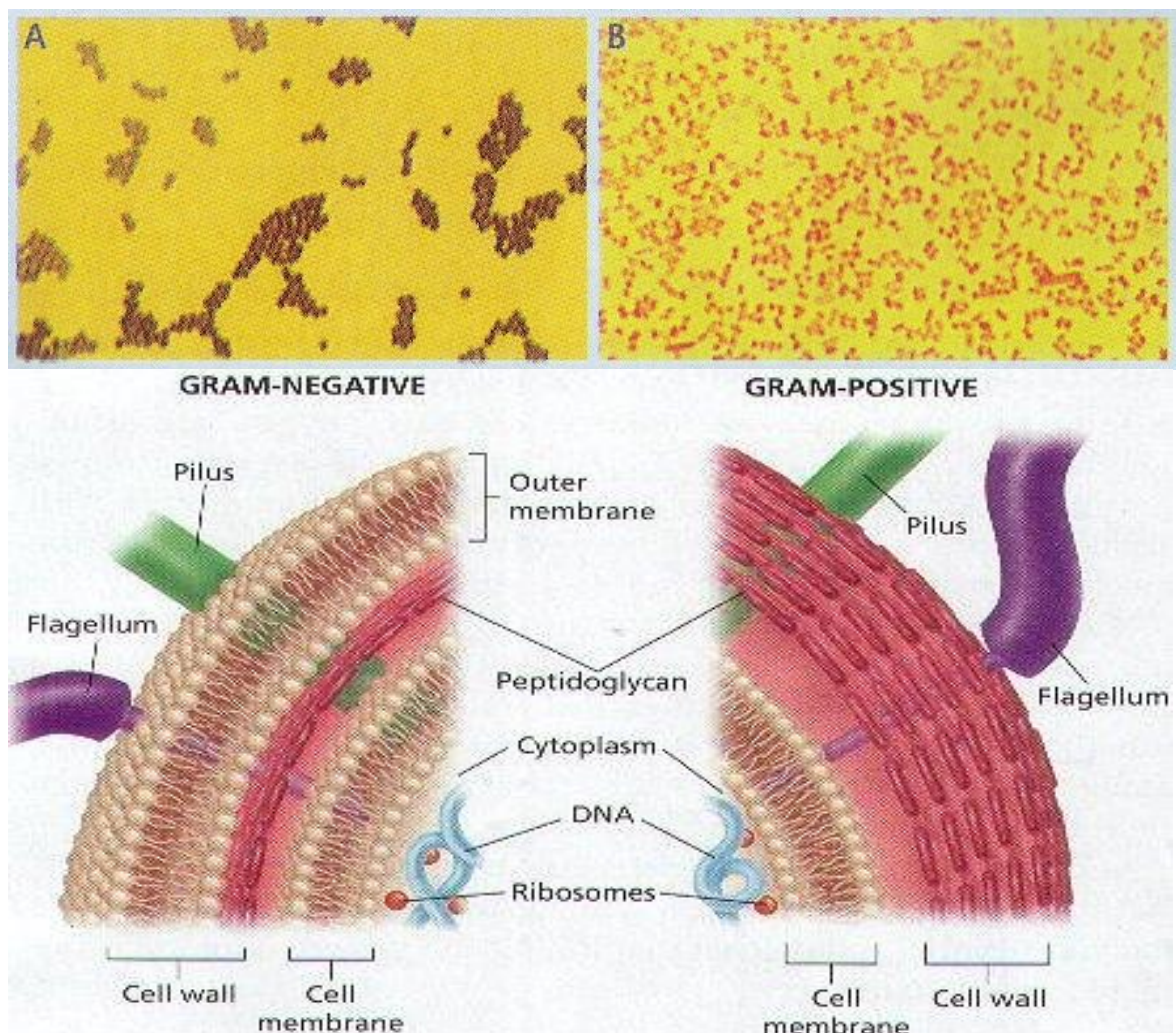


Figura 13 – Microfotografias de bactérias Gram positivas (A) e Gram negativas (B), e representação esquemática da composição química da parede celular das respectivas bactérias. Adaptado de: MARQUES *et al.* (2000); AMERICAN AQUARIUM (2011).

2.4. Urocultura

A urocultura é o exame de urina que identifica a presença de bactérias e permite o seu isolamento, e o mais indicado para o diagnóstico de uma infecção urinária. Foi realizado através da cultura de urina em meios propícios à reprodução de bactérias, nomeadamente nos meios de cultura CLED e Levine.

O meio de cultura CLED permite o crescimento de todos os microrganismos potencialmente patogénicos presentes na urina, e permite diferenciar as bactérias que fermentam a lactose (*Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*) das bactérias não fermentativas (*Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Providencia alcalifaciens*). As bactérias lactose positiva originam colónias amarelas e amarelas-esverdeadas por acidificação do meio (Figura 14). As bactérias não fermentativas originam colónias esverdeadas, azuis ou incolores.

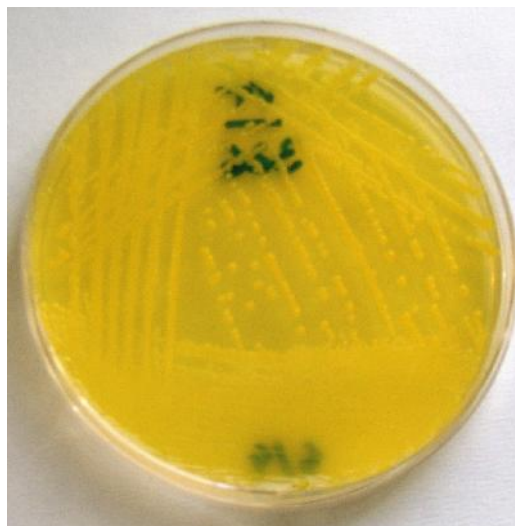


Figura 14 – Fotografia de uma cultura de *Klebsiella* spp. em meio de cultura CLED.

O meio de cultura Levine é um meio parcialmente selectivo, que permite a diferenciação de enterobactérias que fermentam a lactose das que não fermentam. As bactérias que acidificam o meio, lactose e/ou sacarose positivas, apresentam colónias de cor violeta escuro e eventualmente um reflexo metálico (Figura 15). As bactérias não fermentadoras originam colónias incolores ou ligeiramente rosa (BIOMÉRIEUX, 2003).



Figura 15– Fotografia de culturas de *Klebsiella* spp. em meio de cultura Levine.

Etapas do exame cultural:

1 – Sementeira:

- A partir da amostra de urina não centrifugada, semear com ansa calibrada de 1μL os meios de CLED e Levine, pelo método de esgotamento do inóculo, e em zona de assépsia, com o bico de Bunsen ligado;

2 – Incubação:

- Incubar as placas em estufa a 37°C durante 24h;

3 – Interpretação das sementeiras:

- Se não se observar qualquer crescimento ou um crescimento escasso, monomórfico ou polimórfico, reportar como “negativo”;
- Se se observar monomorfismo bacteriano, proceder à contagem de colónias: $<10^3$ UFC/mL (<10 colónias na placa), considerar como “negativo”; $\geq 10^5$ UFC/mL (≥ 100 colónias na placa), valorizar e prosseguir para a identificação e TSA; entre 10^4 e 10^5 UFC/mL (entre 10 e 100 colónias), valorizar em conformidade com a clínica;
- Apenas se valorizam dois microrganismos diferentes no caso de doentes algaliados, ou se a clínica o justificar. Nos outros casos de polimorfismo bacteriano, reportar como contaminação.

2.5. Identificação dos isolados bacterianos

A identificação das bactérias foi realizada com base na morfologia da estirpe isolada, no exame microscópico do esfregaço com coloração de Gram, e em provas bioquímicas.

O estudo bioquímico integra um conjunto de testes que relacionam-se com o metabolismo das bactérias, nomeadamente com a presença de enzimas específicas. Para este estudo é crucial o isolamento das bactérias, impedindo a contaminação para evitar o erro de identificação.

Identificação de enzimas:

- Teste da catalase

Consiste na deteção da enzima catalase, presente na maioria dos microrganismos, cuja função é decompor o peróxido de hidrogénio, libertando o oxigénio. É indispensável na identificação de cocos Gram positivos.

Inicialmente colocou-se uma gota de peróxido de hidrogénio a 3% (v/v) numa lâmina, e com uma ansa repicou-se uma colónia, e esfregou-se nessa gota. A formação de bolhas

indicou-nos que o microrganismo possui a enzima catalase (estafilococos) e a sua ausência indicou-nos que não a possui (estreptococos).

- Teste da coagulase

Das variadas enzimas produzidas por estafilococos, uma assume particular importância, a coagulase. De entre as espécies patogénicas para o Homem, só uma, *S. aureus*, a produz, sendo as restantes denominadas coagulase-negativas.

O teste consistiu num processo de aglutinação, realizado no *Slidex Staph Plus* (Biomérieux), no qual se colocou uma gota de reagente (anticorpos monoclonais dirigidos contra *S. aureus*) e posteriormente dissolveu-se uma colónia do microrganismo em estudo. A presença de aglutinação traduziu um resultado positivo (produção de coagulase - *S. aureus*) e a sua ausência é característico de outras espécies (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*).

- Teste da oxidase

É efectuado numa lâmina descartável (*BBL DrySlide* - BD) e permite determinar a presença ou ausência de actividade de oxidase no citocromo C nas bactérias. Os organismos que contêm o citocromo C como parte da sua cadeia respiratória são positivos para a oxidase e tornam o reagente púrpura (*Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria spp.*); enquanto os que não possuem, não oxidam o reagente deixando-o incolor, pelo que são negativos para a oxidase (família *Enterobacteriaceae*).

Foram escolhidas colónias isoladas, espalhou-se o inóculo directamente na área de reacção das lâminas, e observou-se num espaço de tempo de 20 segundos a presença ou ausência de coloração púrpura.

- Prova da Urease

É realizada através da inoculação do meio por picada central, seguida de incubação a 37°C durante 24h.

A degradação da ureia, pelas bactérias que possuem a enzima urease, é seguida de uma alcalinização do meio devido à acumulação de amónia. Este aumento de pH faz com que o indicador de pH (vermelho de fenol) passe de amarelo a vermelho, sendo uma reacção

positiva para a presença de urease. A ausência da coloração vermelha indica uma reacção negativa.

- Prova do Indol

O objectivo é determinar a capacidade do microrganismo degradar o aminoácido triptofano em produtos metabólicos, nomeadamente indol, mediado pela enzima triptofanase. Utiliza-se um meio de cultura que contenha este aminoácido (água peptonada), e após a inoculação (dissolução no meio) e o crescimento do microrganismo por incubação a 37°C durante 24h, pesquisa-se a presença de indol adicionando o reagente de Kovacs (cor amarelo). Na presença de indol, este reagente reage com ele, produzindo um anel avermelhado na superfície do meio. A persistência da coloração amarela do reagente demonstra que o triptofano não foi hidrolisado a indol, indicando uma reacção negativa.

Metabolismo glicídico e proteico:

- Prova de Kligler

Permite detectar a fermentação da glicose e da lactose, traduzidas por uma acidificação do meio que provoca a viragem do vermelho de fenol a amarelo, bem como, a produção de sulfureto de hidrogénio (H₂S) e gás. Apresenta-se sob a forma de gelose inclinada, na qual, ao nível do sedimento, identifica-se a fermentação da glicose, e ao nível da inclinação, a fermentação da lactose. A produção de H₂S e gás traduzem-se pela formação de um precipitado negro e pelo aparecimento de bolhas de ar, respectivamente, no meio.

O meio é inoculado através de picada vertical até à base, seguido de estrias na rampa, e incubado a 37°C durante 24h.

- Prova do Citrato de Simmons

Permite diferenciar microrganismos atendendo à sua capacidade para usar o citrato como única fonte de carbono, na ausência de glicose ou lactose fermentáveis. O meio de Citrato de Simmons contém citrato de sódio, amónia e o indicador de pH azul de bromotimol, e apresenta-se em tubos em rampa, uma vez que o oxigénio é necessário para

a utilização do citrato. A inoculação do meio consiste numa picada vertical até à base, seguido de estrias na rampa, seguido de incubação a 37°C durante 24h.

Uma reacção positiva é representada pela mudança do meio de cor verde para azul, devido à alcalinização do meio, e pela presença de crescimento na superfície da rampa. Nas culturas citrato negativas, a cor do meio mantém-se verde e não apresentam crescimento no meio de cultura (BIOMÉRIEUX, 2003).

- Teste de mobilidade

A determinação da mobilidade é efectuada no meio SIM, que é um meio semi-sólido. O meio é inoculado por picada central, a partir da cultura em estudo, e incubado a 37°C durante 24 horas. O crescimento da estirpe para fora da picada indica-nos que é móvel, enquanto que se crescer somente no local da picada, é imóvel.

Comportamento bioquímico de *Klebsiella* spp.

Após a observação do esfregaço de Gram, no qual, os bacilos Gram negativos de *Klebsiella* spp. apresentam-se curtos, envolvidos por uma cápsula, e após a observação da cultura em meio Levine, na qual, as colónias apresentam-se cor de rosa e mucóides, procede-se à sua caracterização bioquímica, através de diferentes provas (Figura 16).

O comportamento bioquímico de *Klebsiella* spp. traduz-se de forma positiva na prova de Kligler, pelo que, o meio apresenta cor amarela devido à fermentação da glicose e da lactose, e por norma não produz sulfureto de hidrogénio; é urease positiva, deste modo, o meio fica vermelho devido à degradação da ureia pela enzima urease; é indol negativa, logo o meio mantém a sua cor natural, pelo facto de não ocorrer a degradação do aminoácido triptofano; e citrato positivo, desta forma o meio vira para azul devido à fermentação do citrato. Quanto à mobilidade, trata-se de um microrganismo imóvel, que apenas se desenvolve no local inoculado.

As provas bioquímicas de identificação e o teste de mobilidade permitem também identificar a espécie em causa, de acordo com algumas diferenças no comportamento, tal como referido anteriormente na tabela 1.



Figura 16 – Meios de cultura utilizados nas provas bioquímicas de identificação de *Klebsiella* spp.. Da esquerda para a direita: Prova de Kligler, Citrato de Simmons, Indol e Urease.

2.6. *Teste de sensibilidade aos antimicrobianos*

O objectivo do teste de susceptibilidade é prever, através de uma avaliação *in vitro*, a probabilidade de sucesso no tratamento da infecção com um antimicrobiano específico. A principal função é a detecção de resistência antimicrobiana clinicamente significativa nos microrganismos responsáveis pelas infecções (MURRAY *et al.*, 1995).

O padrão de sensibilidade aos antimicrobianos de todas as estirpes de *Klebsiella* spp. foi determinado pelo método de difusão em disco, no meio de cultura Mueller-Hinton (Biomérieux), segundo a técnica de Kirby-Bauer (Figura 17), de acordo com os padrões da National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Os discos com antimicrobianos impregnados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Antimicrobianos testados para as estirpes de *Klebsiella* spp..

Legenda: S – Sensível; I – Intermédio; R - Resistente

Grupo do Antimicrobiano	Nome do Antimicrobiano		Concentração (µg)	Classificação (mm)
Penicilinas	Amoxicilina		25	S – ≥ 17 I – 14-16 R - ≤ 13
Cefalosporinas	1ª Geração	Cefazolina	30	S – ≥ 18 I – 15-17 R - ≤ 14
	2ª Geração	Cefuroxima	30	S – ≥ 18 I – 15-17 R - ≤ 14
	3ª Geração	Ceftazidima	30	S – ≥ 18 I – 15-17 R - ≤ 14
Amoxicilina + ácido clavulânico	Amoxicilina + Ácido clavulânico		20/10	S – ≥ 18 I – 14-17 R - ≤ 13
Aminoglicosídeos	Tobramicina		10	S – ≥ 15 I – 13-14 R - ≤ 12
Quinolonas	Ciprofloxacina		5	S – ≥ 21 I – 16-20 R - ≤ 15
Sulfametoxazol + trimetoprim	Sulfametoxazol + Trimetoprim		1,25	S – ≥ 17 I – 13-16 R - ≤ 12
Nitrofuronas	Nitrofurantoína		300	S – ≥ 17 I – 15-16 R - ≤ 14

As etapas referentes à preparação do TSA são:

1 – Amostra padrão:

- Preparar uma suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 segundo a escala de McFarland em soro fisiológico, repicando 1 a 2 colónias da placa mãe;

2 – Preparação do inóculo:

- A partir de uma colheita pura, seleccionar colónias isoladas. De seguida, tocar no centro de cada colónia e preparar uma suspensão com uma turvação de 0,5 segundo a escala de McFarland;

3- Inoculação das placas:

- Mergulhar uma zaragatoa no inóculo, retirar o excesso de líquido e semear por estrias apertadas em três ou mais direcções, nas placas de Muller-Hinton;
- Deixar secar o inóculo aproximadamente 5 minutos;
- Distribuir os discos de antibióticos (BD – Difco), após atingirem a temperatura ambiente, na superfície do meio inoculado, com um dispensador mecânico;
- Colocar as placas na estufa a 37°C durante 18 a 24h;

4 – Leitura do antibiograma:

- Após o período de incubação, os halos de inibição (mm) são medidos com uma régua;
- A sensibilidade bacteriana para cada disco testado é classificada em Sensível, Intermédio ou Resistente, de acordo com o diâmetro do halo de inibição.

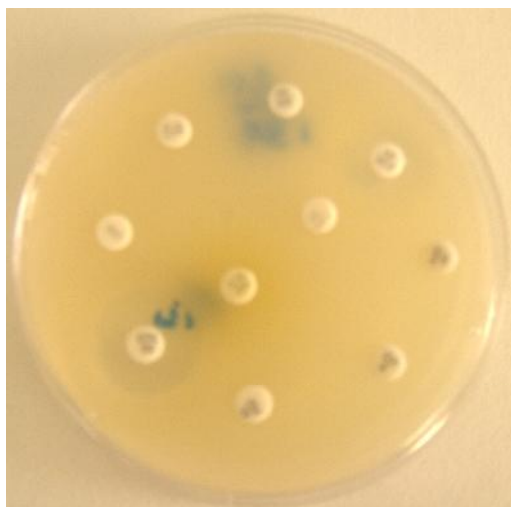


Figura 17 – Fotografia de uma placa do teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM

O presente estudo foi realizado num período de seis meses, de Junho a Novembro de 2010, em meio ambulatório (Avelab-Laboratórios Médicos de Análises Clínicas), no distrito de Aveiro, durante o qual, deram entrada no Serviço de Bacteriologia 12886 amostras de urina para realização do exame bacteriológico (Figura 18).

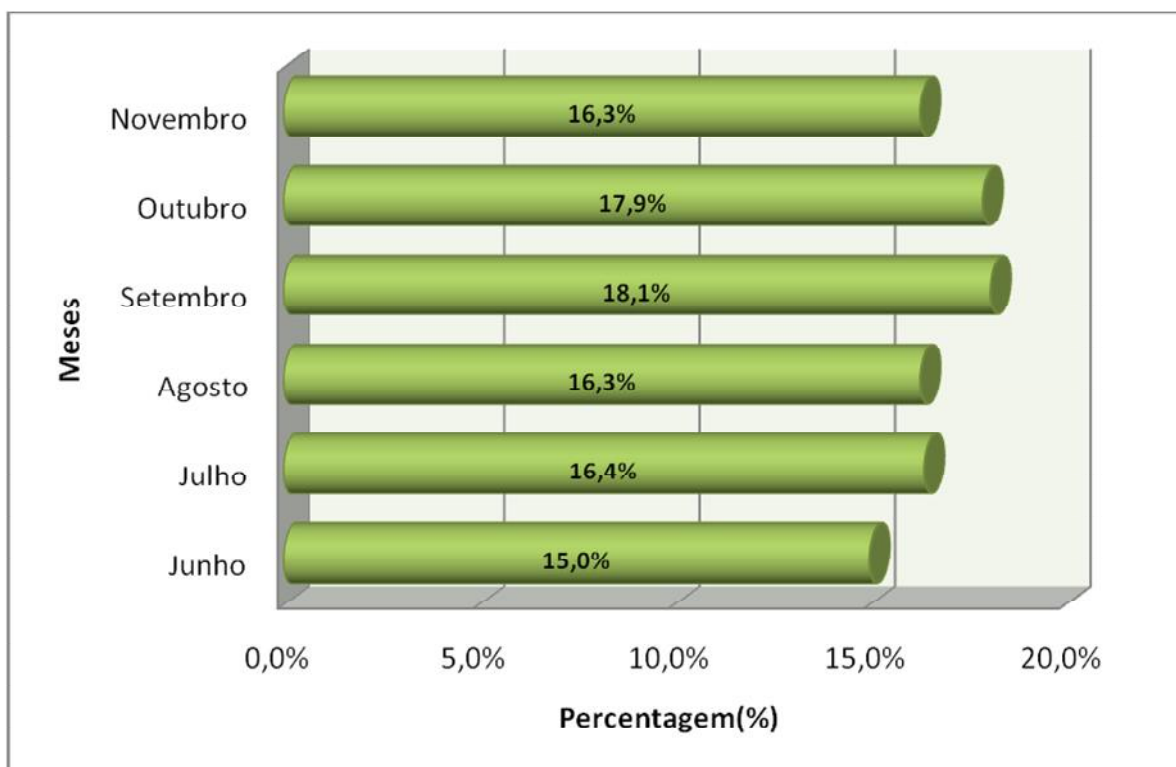


Figura 18 – Distribuição do número de exames bacteriológicos de urina realizados ao longo de seis meses.

Destas, o exame cultural foi negativo em 10829 amostras (84%) e positivo em 2057 amostras (16%), sendo estas últimas responsáveis pelas infecções urinárias (Figuras 19 e 20).

A elevada percentagem de amostras negativas é, possivelmente, devido à grande quantidade de uroculturas que se realizam como controlo pós-tratamento e a grávidas,

assim como pelo grande número de síndromes uretrais causados por agentes não bacterianos (CORREIA *et al.*, 2007).

Neste estudo, todas as amostras dos pacientes que obtiveram um diagnóstico positivo na realização do exame bacteriológico (urocultura), foram alvo de tratamento estatístico.

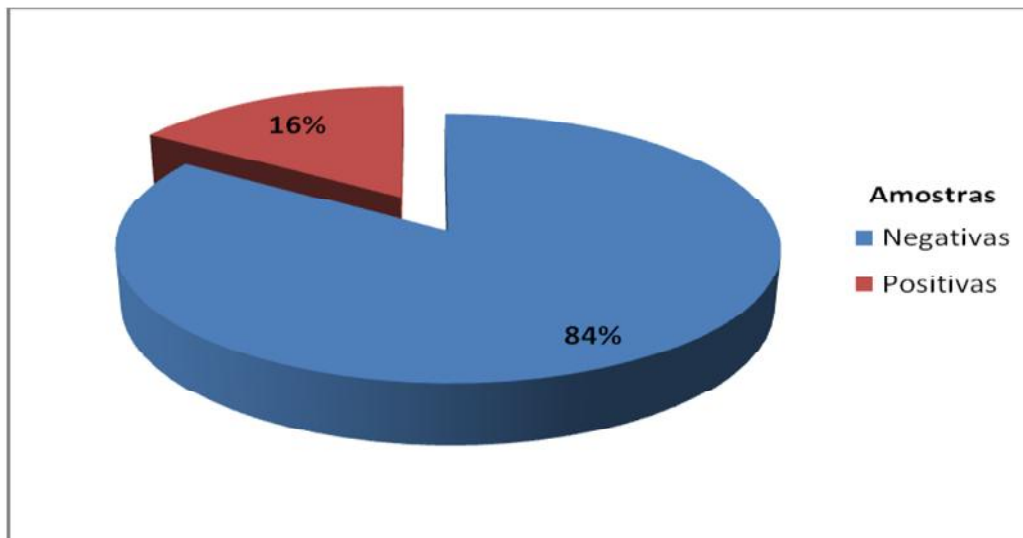


Figura 19 – Resultados dos exames bacteriológicos de urina.

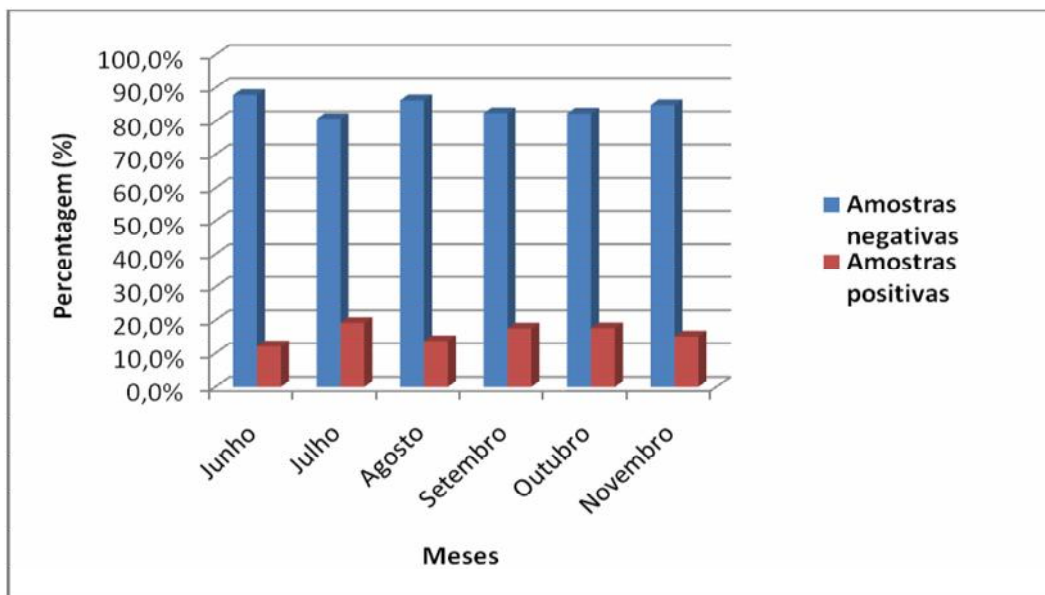


Figura 20 – Distribuição dos resultados dos exames bacteriológicos de urina ao longo de seis meses.

Da totalidade de uroculturas positivas, 81,4% eram provenientes de indivíduos do sexo feminino e 18,6% do sexo masculino (Figura 21), sendo bastante evidente a frequência do sexo feminino, tal como evidenciado em vários estudos, pois a localização da uretra próxima do ânus facilita a ascensão das enterobactérias e subsequente infecção da bexiga (BAIL *et al.*, 2006; GARÍN *et al.*, 2005; MENDO *et al.*, 2008). No sexo masculino, verifica-se que as ITU são menos frequentes pelo facto de possuírem uma uretra longa e pela acção antibacteriana do líquido prostático (MENDO *et al.*, 2008).

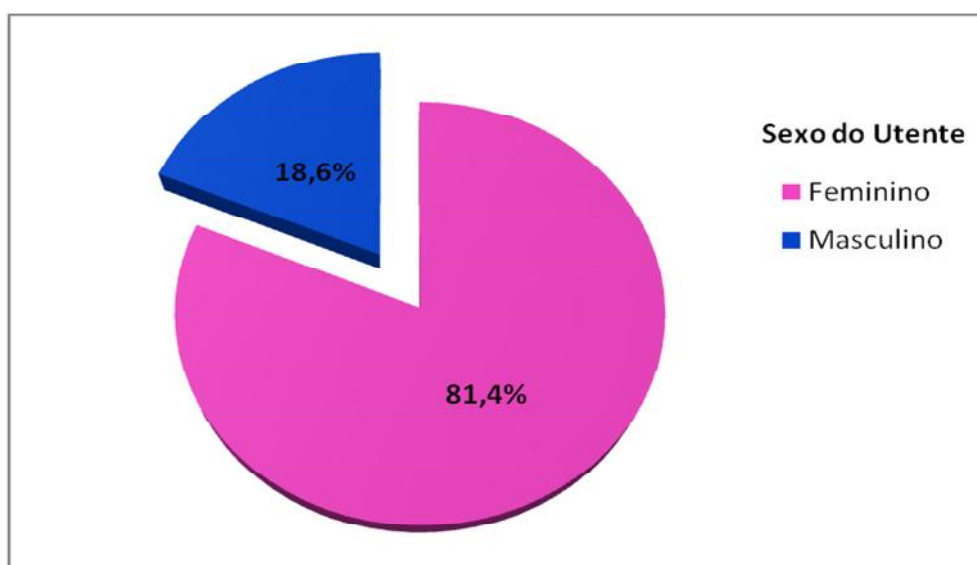


Figura 21– Distribuição do número de indivíduos do sexo feminino e do sexo masculino, nos quais o exame bacteriológico foi positivo.

A média de idades dos indivíduos do sexo feminino foi de 61 anos e a dos indivíduos do sexo masculino foi de 67 anos, sendo que a idade varia entre os 0 e 100 anos. Tal como noutro estudo, também aqui verificou-se que a média de idade foi superior a 50 anos (GARÍN *et al.*, 2005).

As classes etárias em que se verificou a maior frequência de ITU são as compreendidas entre os 61-70 anos (com 19,9% correspondente ao sexo masculino e 17,6% ao sexo feminino), 71-80 anos (com 26,7% correspondente ao sexo masculino e 23,6% ao sexo feminino) e 81-90 anos (com 20,2% correspondente ao sexo masculino e 17,1% ao sexo feminino).

No sexo feminino verifica-se um pico significativo entre os 21 e 40 anos, e posteriormente entre os 61 e 80 anos. Por outro lado, nos homens observa-se que a partir dos 31 anos começam a surgir ITU com maior frequência, existindo um máximo entre os 61 e 80 anos, comparável ao referido na literatura. Nos primeiros meses de vida, o sexo masculino é o que tem maior incidência de ITU devido a um maior número de malformações congénitas (MENDO *et al.*, 2008), tal como observado neste estudo, em que apresenta a maior taxa de uroculturas positivas entre os 0 e os 10 anos (Figura 22).

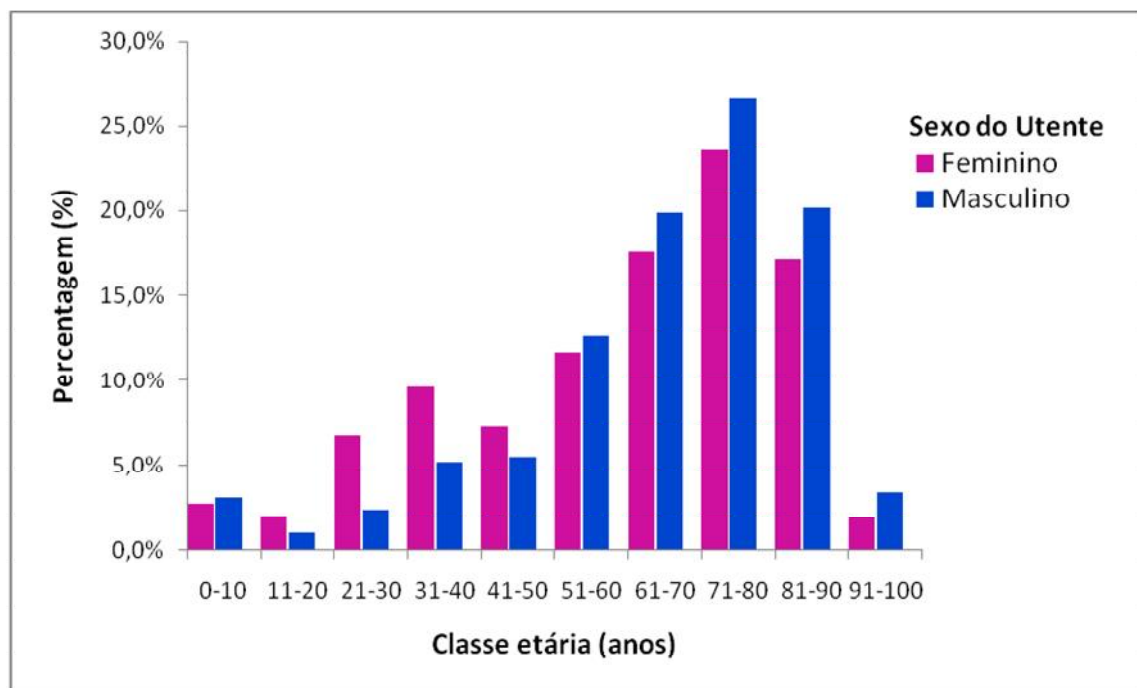


Figura 22 – Distribuição do número de uroculturas positivas por classe etária e por sexo do utente.

Segundo um estudo realizado em meio ambulatório na região de Espanha, e tal como evidenciado neste estudo, nas mulheres, o primeiro pico de incidência de ITU é entre os 20 e 35 anos, afectando mulheres jovens, saudáveis e no início de uma vida sexual activa, e um segundo pico entre os 65 e 85 anos, relacionado com as mudanças anatómicas e hormonais da menopausa, (GARÍN *et al.*, 2005), limitações nos hábitos de higiene e debilidade do sistema imunitário (COSTA *et al.*, 2009).

Nos homens, a incidência de ITU aumenta a partir da idade de início das relações sexuais, sendo máxima entre os 65 e 85 anos devido a patologias obstrutivas do tracto urinário inferior (GARÍN *et al.*, 2005), cálculo vesicular, cateterismo e diabetes (MENDO *et al.*, 2008).

2. ETIOLOGIA

As ITU representam em ambos os sexos a segunda causa de infecção comunitária, a seguir às de origem respiratória, causando uma morbidade significativa e elevados custos de saúde (GARÍN *et al.*, 2005). Nos Estados Unidos da América as infecções urinárias são as infecções bacterianas mais comuns, causando 100000 hospitalizações por ano (MARQUES *et al.*, 2005). As enterobactérias são as responsáveis pela maioria dos casos (BAIL *et al.*, 2006).

Após a identificação bacteriana, foram obtidos 19 isolados bacterianos potencialmente diferentes, referenciados como os principais agentes responsáveis pelas ITU. No presente estudo, observou-se que os de maior frequência, independentemente do sexo, foram *Escherichia coli* (57,6%), *Klebsiella* spp. (13,8%) e *Proteus mirabilis* (4,8%)

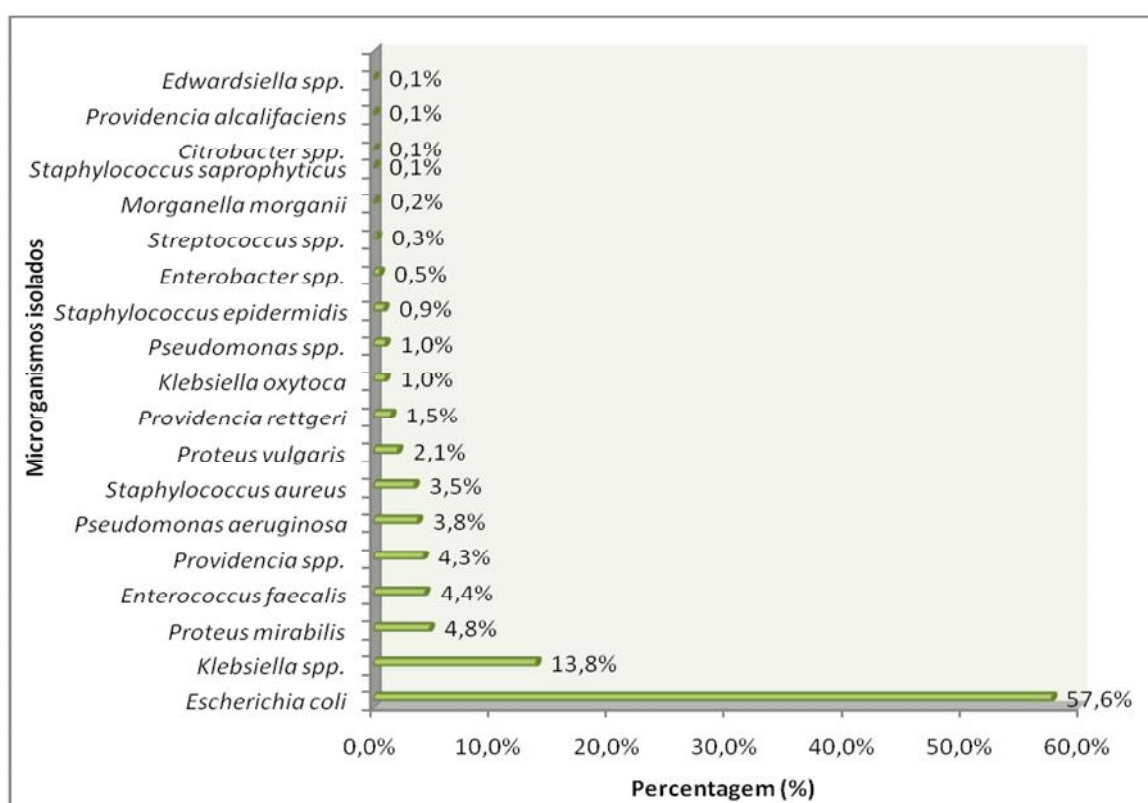


Figura 23– Distribuição dos agentes etiológicos responsáveis pelas infecções urinárias.

(Figuras 23 e 24), tal como no estudo de Costa *et al.* (2009), realizado em ambulatório, também em Portugal.

Os principais agentes descritos causadores de infecções adquiridas na comunidade do distrito de Aveiro são *Escherichia coli* (53-72%), *Klebsiella* spp. (6-12%), *Enterococcus* spp. (1,7-12%) e *Proteus* spp. (4-6%) (MARQUES *et al.*, 2005). Os valores verificados neste estudo em relação aos isolados bacterianos com maior frequência estão dentro dos limites descritos na literatura, à excepção da *Klebsiella* spp. (13,8%) que está acima dos valores, e a qual foi alvo de estudo para a determinação do perfil de resistência a determinados antimicrobianos.

Tal como evidenciado noutros estudos realizados nos Estados Unidos da América, França, Espanha e Portugal, *Escherichia coli* é o principal agente responsável por ITU na comunidade, seguido de outros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (COSTA *et al.*, 2009).

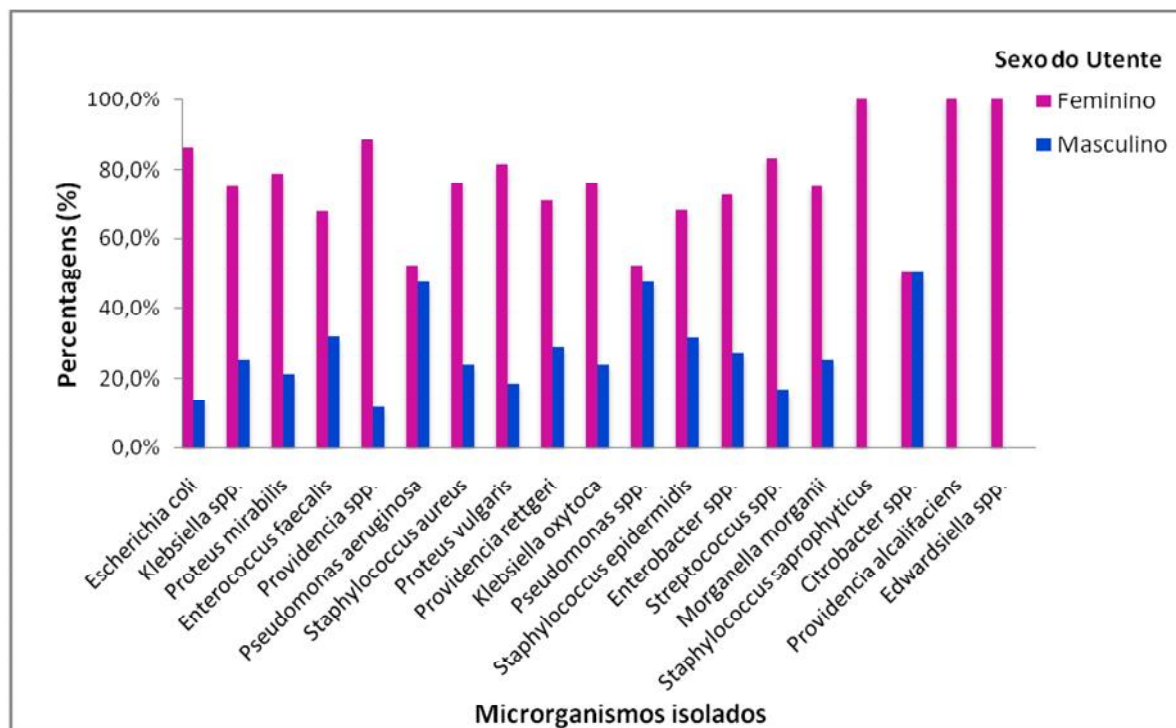


Figura 24– Distribuição das infecções urinárias por agente etiológico e por sexo.

3. SUSCEPTIBILIDADE DE ESTIRPES DE *KLEBSIELLA* SPP. AOS ANTIMICROBIANOS

O conhecimento periódico e actualizado dos padrões de susceptibilidade bacteriana de uma determinada área geográfica permite a escolha de um tratamento empírico eficaz, a optimização de custos, evita o aparecimento de resistências e contribui para o uso racional dos antimicrobianos. Um antimicrobiano usado como tratamento de primeira linha deveria ser eficaz contra a maioria dos microrganismos responsáveis pelas ITU e ter um perfil de segurança razoável. As taxas de resistência superiores a 20% são consideradas limitantes na escolha de um antimicrobiano de forma empírica (GARÍN *et al.*, 2005; BAIL *et al.*, 2006).

Assim, crê-se que o conhecimento do perfil de resistência de *Klebsiella* spp. face a determinados antimicrobianos, através deste estudo, poderá fornecer algumas recomendações na escolha do antimicrobiano.

Do total de amostras obtidas (12886) para a realização do presente estudo, 2057 amostras foram positivas no exame bacteriológico de urina. Assim, após a identificação dos agentes etiológicos, responsáveis pelas infecções urinárias, foi escolhido um dos microrganismos mais frequentes, como alvo de estudo do perfil de resistência a antimicrobianos.

Uma vez que *Escherichia coli* foi o microrganismo mais frequente (57,6%), e já tinha sido efectuado um estudo no mesmo local (DIAZ, 2009), relativo ao seu perfil de resistência aos antimicrobianos, foi escolhido o segundo microrganismo mais frequente para aprofundar este estudo, que foi *Klebsiella* spp. (13,8%).

Para a avaliação do perfil de resistências das estirpes de *Klebsiella* spp. foram realizados os TSA. Assim, foi seleccionado um antimicrobiano representante de cada grupo, uma vez que, com a prática laboratorial constatou-se que o comportamento das estirpes face aos antimicrobianos do mesmo grupo é semelhante.

Ao total de 286 amostras positivas para *Klebsiella* spp., foram testados 9 antimicrobianos: grupo das penicilinas – Amoxicilina (AM); grupo das cefalosporinas 1^a, 2^a e 3^a geração – Cefazolina, Cefuroxima, Ceftazidima; Amoxicilina+Ácido clavulânico (AMC); grupo dos aminoglicosídeos – Tobramicina; grupo das quinolonas – Ciprofloxacina; Sulfametoxazol+Trimetoprim (SXT); e Nitrofurantoína (Figura 25).

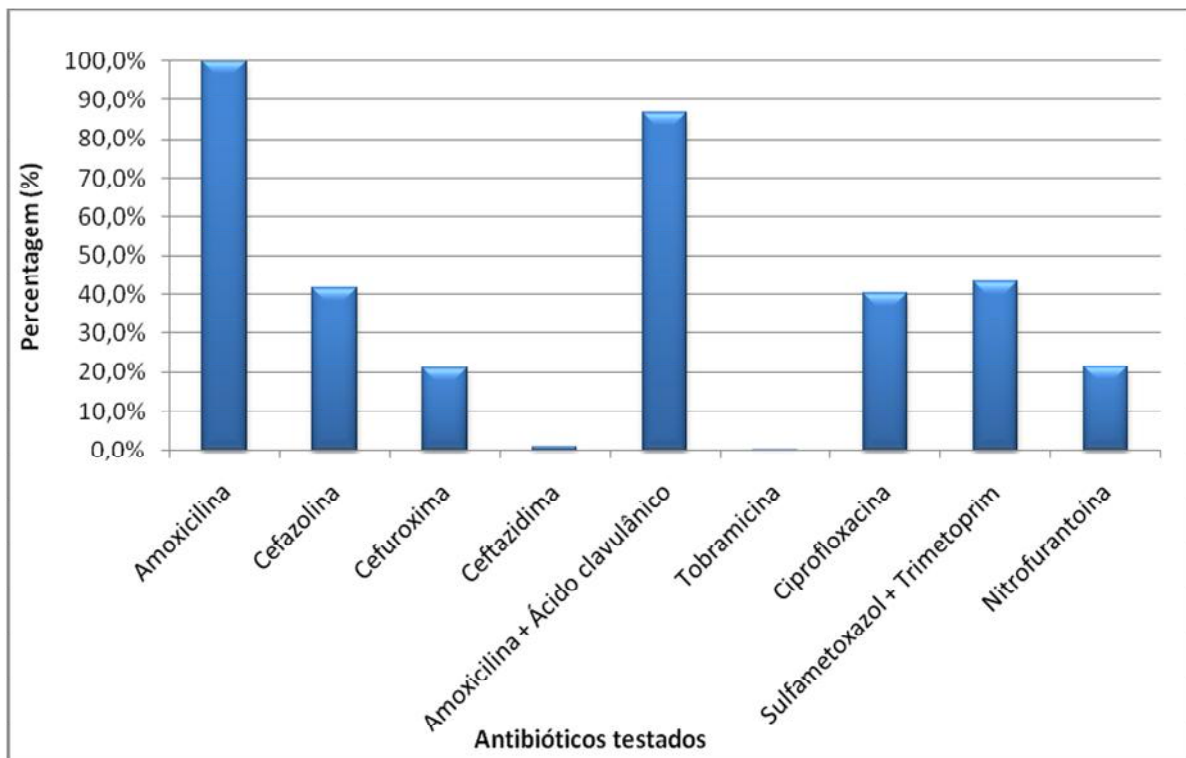


Figura 25 – Perfil de resistência de estirpes de *Klebsiella* spp. a determinados antimicrobianos.

Todas as estirpes de *Klebsiella* spp. foram resistentes à AM (100%), evidenciando a resistência natural destas estirpes ao grupo das penicilinas, através da produção de β -lactamases, que sendo uma propriedade genética, é transmitida de geração em geração. A produção de enzimas β -lactamases representa o principal factor de resistência das bactérias Gram negativas aos β -lactâmicos (PASTA *et al.*, 2008), constata-se uma crescente prevalência bem como uma evidente evolução (PITOUT *et al.*, 2005).

Klebsiella spp. apresenta elevada resistência a AMC (86,7%), tal como no estudo realizado por Costa *et al.* num laboratório de Lisboa durante igual período. O ácido clavulânico quando conjugado à amoxicilina, exerce uma função de inibição das β -lactamases, permitindo alargar o espectro de actividade das substâncias antimicrobianas. Esta associação permitiu baixar a taxa de resistência em 13,3%. O maior número de dias de tratamento e, consequentemente, a maior dificuldade no cumprimento do tratamento, poderá ser responsável pela elevada frequência de resistência (COSTA *et al.*, 2009).

O antimicrobiano SXT foi o terceiro com maior taxa de resistência (43,0%), constatando-se na literatura que a sua resistência tem aumentado em todo o mundo, inclusive nas infecções comunitárias (BAIL *et al.*, 2006). Este antimicrobiano foi durante décadas o tratamento empírico de eleição das ITU, devido ao seu sinergismo, tolerância, baixo custo, elevado espectro antimicrobiano e elevada concentração urinária (GARÍN *et al.*, 2005), contudo o aumento da resistência bacteriana tem limitado a sua eficácia nos últimos anos (MURRAY *et al.*, 1995).

A ciprofloxacina apresenta uma taxa de resistência (40,2%) próxima do SXT. O uso frequente deste antimicrobiano no tratamento de ITU poderá ter sido o factor responsável pelo aumento da resistência bacteriana. As quinolonas apresentam elevada biodisponibilidade, excelente penetração renal e prostática, alcançam elevadas concentrações urinárias, pelo que são recomendadas para o tratamento de ITU, inclusive complicadas. Contudo, o aumento da sua prescrição aumenta a sua resistência (GARÍN *et al.*, 2005), relatada também em outros países como a Índia e Brasil (BAIL *et al.*, 2006).

Os antimicrobianos que apresentaram a menor prevalência de resistência face a estirpes de *Klebsiella* spp. foram a tobramicina, ceftazidina, cefuroxima e nitrofurantoína.

A tobramicina (aminoglicosídeo) foi o antimicrobiano que demonstrou a menor taxa de resistência (0,3%). É um agente bactericida activo contra bacilos Gram negativos aeróbios, particularmente da família *Enterobacteriaceae*, e *Staphylococcus aureus*. Os aminoglicosídeos apresentam uma baixa absorção gastrointestinal, provocam uma toxicidade intrínseca considerável (MURRAY *et al.*, 1995) e têm o inconveniente de serem administrados por via intra-muscular, pelo que, são utilizados somente em casos extremos.

As cefalosporinas são agrupadas em gerações de acordo com as características gerais da sua actividade antimicrobiana, deste modo foram testadas uma de cada geração (1^a, 2^a e 3^a). A cefazolina (1^a geração) foi a que apresentou maior resistência (41,6%), relativamente à Cefuroxima (2^a geração) (21,0%) e Ceftazidima (3^a geração) (1,0%).

A 1^a geração (espectro estreito) tem uma boa actividade para os Gram positivos e uma actividade relativamente modesta para os Gram negativos, nomeadamente algumas estirpes de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus mirabilis*. A 2^a geração são estáveis a certas β -lactamases produzidas por bactérias Gram negativas e como resultado, têm um aumento de actividade contra estes microrganismos. As cefalosporinas de 3^a geração são muito mais activas contra *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*. O seu amplo espectro de actividade nas bactérias Gram negativas é devido à sua estabilidade às β -lactamases e à sua capacidade de penetração nos bacilos Gram negativos (MURRAY *et al.*, 1995).

A escolha de cefalosporinas de 1^a geração no tratamento de ITU é frequente pela sua fácil administração oral, em oposto às de 2^a e 3^a geração, administradas sob a forma de injectáveis com supervisão do médico.

A resistência às cefalosporinas é proporcionada pela produção de β -lactamases de amplo espectro (ESBL) (PASTA *et al.*, 2008). Estas enzimas estão frequentemente codificadas em plasmídeos, que medeiam a sua disseminação entre espécies (TAFUR *et al.*, 2008).

A nitrofurantoína apresentou uma taxa de resistência baixa (21,3%), sendo considerada uma alternativa para o tratamento de ITU não complicadas (BAIL *et al.*, 2006), pois apresenta um amplo espectro antimicrobiano e uma elevada excreção renal (GARÍN *et al.*, 2005). O estudo realizado por MARQUES *et al.* (2005), relativo às sensibilidades antimicrobianas de uropatógenos presentes na comunidade, aponta a nitrofurantoína como um antimicrobiano eficaz numa grande percentagem dos casos. No entanto, os seus efeitos secundários a nível gastrointestinal, e de forma mais severa ao nível pulmonar em pacientes idosos, limita o seu uso.

De acordo com os resultados obtidos, no tratamento das infeções urinárias adquiridas na comunidade causadas por estirpes de *Klebsiella* spp., no distrito de Aveiro, os antimicrobianos do grupo das penicilinas não têm qualquer tipo de acção sobre estas

estirpes, devido à sua resistência intrínseca ou natural. Não é recomendável o uso da AMC e SXT como antimicrobianos de primeira escolha devido às suas elevadas taxas de resistência. Por sua vez, os aminoglicosídeos e cefalosporinas de 2^a e 3^a geração são uma boa opção de escolha pela sua baixa taxa de resistência, mas têm o inconveniente de se apresentarem na forma de injectável. A nitrofurantoína, pelos seus efeitos adversos, não é uma excelente opção.

No estudo realizado por BAIL *et al.* (2006), no Canadá, onde foi avaliada a resistência bacteriana de isolados do tracto urinário de pacientes ambulatoriais, foi constataada uma maior eficiência da nitrofurantoína e da ciprofloxacina, relativamente ao SXT e ampicilina, na terapia empírica das ITU.

V. CONCLUSÃO

O uso irracional dos antimicrobianos e a falta de conhecimento relativo aos mecanismos de resistência das bactérias, tem conduzido à escassez do número de opções terapêuticas. Devido à falta de antimicrobianos capazes de agir contra estes mecanismos de resistência, a criação de campanhas educativas e protocolos que visem orientar o uso adequado destas substâncias é muito importante para preservar os poucos antimicrobianos disponíveis.

Devido a possíveis mudanças na frequência dos agentes etiológicos responsáveis por ITU, bem como, no perfil de resistência a antimicrobianos, o estudo de uroculturas provenientes de pacientes com suspeita de ITU fornecem importantes informações para uma terapêutica empírica mais adequada e contribuem para a realização de um controlo da dispersão destes agentes. Assim, este trabalho permitiu avaliar a frequência de *Klebsiella* spp. como causa de ITU, na região de Aveiro durante um semestre, bem como conhecer o seu padrão de resistência.

Após a realização deste estudo, conclui-se que:

- A maioria das ITU na comunidade ocorrem entre os 71 e 80 anos, sendo o sexo feminino o que possui uma maior taxa de uroculturas positivas;
- *Escherichia coli* foi o microrganismo mais frequente responsável por ITU na comunidade, tal como evidenciado pela maioria dos estudos, seguida de *Klebsiella* spp. e outros pertencentes à família *Enterobacteriaceae*;
- Estirpes de *Klebsiella* spp. apresentaram maiores taxas de resistência à amoxicilina+ácido clavulânico e sulfametoxazol+trimetoprim, e total resistência à amoxicilina;
- A crescente resistência antimicrobiana de *Klebsiella* spp. proveniente de pacientes com infeções urinárias adquiridas na comunidade, propõe um uso irracional dos antimicrobianos de forma empírica, bem como a interrupção do tratamento;
- Os antimicrobianos que apresentaram melhor acção face à *Klebsiella* spp. foram a tobramicina, ceftazidima, cefuroxima e nitrofurantoína, pelas suas baixas taxas de resistência. Contudo, são opções limitantes no tratamento de ITU, devido aos seus efeitos adversos ou por serem administradas por via injectável.

VI. BIBLIOGRAFIA

- AKRAM, M.; SHAHID, M.; KHAN, A. U. - Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections in J N M C Hospital Aligarh, India. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. Vol. 6 (4) (2007), p. 1-7.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J., *ET AL.* - Introduction to Pathogens. In Molecular Biology of the Cell. 4ª ed. New York: Garland Science (2002). ISBN-10: 0-8153-3218-1.
- AL-HASAN, M. N.; LAHR, B. D.; ECKEL-PASSOW, J. E., *ET AL.* - Epidemiology and Outcome of *Klebsiella* Species Bloodstream Infection: A Population-Based Study. Mayo Clinic Proceedings. Vol. 85 (2) (2010), p. 139-144.
- AMERICAN AQUARIUM. Gram negative/Gram positive bacteria. [Em linha]. [Consult. 30 Julho. 2011]. Disponível em WWW.<URL: http://www.americanaquariumproducts.com/Aquarium_Medication.html.
- AUSTIN COMMUNITY COLLEGE. Renal anatomy. [Em linha]. [Consult. 30 Julho. 2011]. Disponível em WWW.<URL: <http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/Renal.html#renalanatomy>.
- BAIL, L.; ITO, C. A. S.; ESMERINO, L. A. - Infecção do trato urinário: comparação entre o perfil de susceptibilidade e a terapia empírica com antimicrobianos. Revista Brasileira Análises Clínicas. Vol. 38 (1) (2006), p. 51-56.
- BIOMÉRIEUX – Manual de meios de cultura e suplementos (2003).
- CORREIA, C.; COSTA, E.; PERES, A., *ET AL.* - Etiologia das infecções do tracto urinário e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. Acta Médica Portuguesa. Vol. 20 (2007), p. 543-549.
- COSTA, M. C.; PEREIRA, P. M.; BOLOTINHA, C., *ET AL.* - Frequência e Susceptibilidade Bacteriana em Infecções Urinárias –dados de um laboratório de Lisboa. Parte II. Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde. Vol. 1 (6), p. 87-103.
- D'AGATA, E. M. C.; DUPONT-ROUZEYROL, M.; MAGAL, P., *ET AL.* - The Impact of Different Antibiotic Regimens on the Emergence of Antimicrobial-Resistant Bacteria. Plos One. Vol. 3 (2008), p. 1-9.

- DIAZ, R. C. S. – Prevalência e resistência de *Escherichia coli* em ambulatório. Universidade de Aveiro (2009);
- FERREIRA, W. F. C. AND SOUSA, J. C. F. – Microbiologia. Editora Lidel (1998). ISBN 972-757-024-0. Vol. 1 e 2, p. 239-248 e p. 101.
- FONSECA, A. B.; SEBASTIÃO, C.; MARTINS, F. J. C., *ET AL.* – Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde Drº Ricardo Jorge (2004), p. 31-32.
- FROST, L. S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A. O., *ET AL.* - Mobile Genetic Elements: the agents of open source evolution. Nature Reviews. Vol. 3 (2005), p. 722-732.
- GARÍN, J. A. L.; SANTOS, J. P.; COSTA, M. S., *ET AL.* – Evolución de la resistencia antibiótica en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Revista Clínica Española. Vol. 205 (6) (2005), p. 259-264.
- GARRETT, J.; OSSWALD, W.; GUIMARÃES, S. - Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. 3ª ed. Porto Editora (1997).
- GIL, J. V.; BERRUTI, J. E. B.; SIERRA, D. D., *ET AL.* - Bacteriología y resistencias en las infecciones urinarias ambulatorias. Atención primaria. ISSN 0212-6567. Vol. 18, nº 6 (1996), p. 315-317.
- HAWKEY, P. M. - The origins and molecular basis of antibiotic resistance. British Medical Journal. Vol. 317 (1998), p. 657-660.
- KALLEN, A. J.; WELCH, H. G.; SIROVICH, B. E. - Current Antibiotic Therapy for Isolated Urinary Tract Infections in Women. Archives of Internal Medicine. Vol 166 (2006), p. 635-639.
- KOCH, C. R.; RIBEIRO, J. C.; SCHNOR, O. H., *ET AL.* – Resistência antimicrobiana dos uropatógenos em pacientes ambulatoriais, 2000-2004. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 41 (3) (2008), p. 277-281.
- HOPLEY, I. AND SCHALKWYK, J. V. Mechanisms of resistance to antimicrobials. [Em linha]. [Consult. 29 Julho. 2011]. Disponível em WWW.<URL: <http://www.anaesthetist.com/icu/infect/Findex.htm#resist.htm>>.
- LENNETTE, E.; BALOUS, A.; HAUSLER, W. – Manual of Clinical Microbiology. 4ª ed. Washington DC: American Society for Microbiology (1985).

- MACLEAN, R. C.; HALL, A. R.; PERRON, G. G., *ET AL.* – The Evolution of Antibiotic Resistance: Insight into the Roles of Molecular Mechanisms of Resistance and Treatment Context. Discovery Medicine. Vol. 10 (51) (2010), p.112-118.
- MARQUES, E.; SOARES, R.; ALMEIDA, C. – Técnicas Laboratoriais de biología – Bloco I. Porto Editora (2000). ISBN 972-0-42137-1. p. 71 e 73.
- MARQUES, N.; ARAÚJO, F.; DUCLA-SOARES, J. L. – Infecções e Antibioterapia num Serviço de Medicina. Medicina Interna. Vol. 12, nº 4 (2005), p. 203-208.
- MARTINS, F.; VITORINO, J.; ABREU, A. – Avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de microorganismos isolados em urinas na região do Vale do Sousa e Tâmega. Acta Médica Portuguesa. Vol. 23 (2010), p. 641-646.
- MASHOUF, R. Y.; BABALHAVAELI, H.; YOUSEF, J. - Urinary Tract Infections: Bacteriology and Antibiotic Resistance Patterns. Indian Pediatrics. Vol. 46 (2009), p. 617-620.
- MENDO, A.; ANTUNES, J.; COSTA, M. C., *ET AL.* - Frequência de Infecções Urinárias em Ambulatório – dados de um laboratório de Lisboa. Parte I. Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde. Vol. 5 (2) (2008), p. 216-223.
- MENEZES, E. A.; CARNEIRO, H. M.; CUNHA, F. A.; *ET AL.* - Frequência de Microrganismos Causadores de Infecções Urinárias Hospitalares em Pacientes do Hospital Geral de Fortaleza. Revista Brasileira de Análises Clínicas. Vol. 37 (4) (2005), p. 243-246.
- MILLER, L. G. AND TANG, A. W. - Treatment of Uncomplicated Urinary Tract Infections in an Era of Increasing Antimicrobial Resistance. Mayo Clinic Proceedings. Vol. 79 (8) (2004), p. 1048-1054.
- MURRAY, P. R.; BARON, E. JO; PFALLER, M. A., *ET AL.*- Manual of Clinical Microbiology. 6ª ed. Washington DC: American Society for Microbiology (1995).
- NICOLLE, L.; ANDERSON, P. A. M.; CONLY, J., *ET AL.* - Uncomplicated urinary tract infection in women: Current practice and the effect of antibiotic resistance on empiric treatment. Canadian Family Physician. Vol. 52 (2006), p. 612-618.
- PASTA, A. A. C.; FRAÇÃO, F. H. A.; MAGALHÃES, G. L. G., *ET AL.*- Prevalência e Perfil de Susceptibilidade antimicrobiana em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), isoladas de pacientes do

- Hospital Universitário/UEL. Revista Brasileira de Análises Clínicas. Vol. 40 (2) (2008), p. 137-141.
- PIRES, M. C. S.; FROTA, K. S.; JUNIOR, P. O. M., *ET AL.* - Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Vol. 40 (6) (2007), p. 643-647.
 - PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K. B., *ET AL.* – Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 56 (2005), p. 52-59.
 - PODSCHUN, R. AND ULLMANN, U. - *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 11, nº 4 (1998), p. 589-603.
 - PRAIS, D.; STRAUSSBERG, R.; AVITZUR, Y., *ET AL.* -Bacterial susceptibility to oral antibiotics in community acquired urinary tract infection. Archives Disease Childhood. Vol. 88 (2003), p. 215-218.
 - RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M., *ET AL.* – Farmacologia. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier editor (2004).
 - RAZ, R.; OKEV, N.; KENNES, Y., *ET AL.* - Demographic Characteristics of Patients with Community- Acquired Bacteriuria and Susceptibility of Urinary Pathogens to Antimicrobials in Northern Israel. Israel Medical Association Journal. Vol. 2 (2000), p. 426-429.
 - REINHARDT, D. – Antibiotic Resistance Mechanisms of Bacteria – Bacterial resistance to antimicrobials is significant and important. Suite 101 (2009).
 - RELMAN, D. A.; HAMBURG, M. A.; CHOFFNES, E. R., *ET AL.* - Antibiotic Resistance: Origins and Countermeasures. In Microbial Evolution and Co-Adaptation: A Tribute to the Life and Scientific Legacies of Joshua Lederberg. Washington (DC): The National Academies Press (2009). Cap. 4, p. 165.
 - SHARP, Merck AND DOHME – Infecções das vias urinárias. In Manual Merck – Saúde para a Família. New Jersey: Editorial Oceano (2008). ISBN 84-494-1184-X. Cap. 127, p. 648-652.

- SMELTZER, S. C. AND BARE, B. G. – Infecções do Tracto Urinário. In Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan (2002). Vol. 2, p. 1086-1091.
- TABIBIAN, J. H.; GORNBEIN, J.; HEIDARI, A., *ET AL.* - Uropathogens and Host Characteristics. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 46, nº 12 (2008), p. 3980-3986.
- TAFUR, J. D.; TORRES, J. A.; VILLEGAS, M. V. – Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Association Colombiana de Infectologia. Vol. 12, nº 3 (2008), p. 217-224.
- UMEH, O. AND BERKOWITZ, L. B. – *Klebsiella* Infections (2009).
- WALKER, Richard – Enciclopédia do Corpo Humano. Porto: Editora Dorling Kindersley (2002).
- WANNMACHER, L. – Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? Organização Pan-Americana da Saúde. Vol.1, nº 4 (2004), p. 1-6. ISBN 1810-0791.
- WIKIPEDIA. Sulfamethoxazole – Mechanism of action. [Em linha]. [Consult. 30 Julho. 2011]. Disponível em WWW.<URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Sulfamethoxazole>.
- WIKIPEDIA. Tn3 Transposon – Mechanism of replication. [Em linha]. [Consult. 30 Julho. 2011]. Disponível em WWW.<URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Tn3_Transposon.
- ZIEVE, D. AND VORVICK, L. J. – Urinary tract infection –adults. In Medical Encyclopedia. A.D.A.M. (2010).

ANEXO I

Composição dos meios de cultura

Meio de cultura (marca comercial)	Composição
Levine (Biomérieux)	Peptona de gelatina; Lactose (bovina); Sacarose; Fosfato bipotássico; Eosina; Azul de metileno; Agar.
CLED (Biokar)	Peptona de gelatina (bovina ou porcina); Peptona de caseína (bovina); Extracto de carne (bovino ou porcino); Lactose (bovina); L. cistina; Azul de bromotimol; Agar.
Kligler (BD)	Peptona de caseína e de carne (bovina e porcina); Lactose (bovina); Glicose; Cloreto de sódio; Citrato de ferro amoniacal; Tiosulfato de sódio; Agar; Vermelho de fenol.
Ureia (Oxoid)	L-Triptofano; Fosfato monopotássico; Fosfato bipotássico; Cloreto de sódio; Ureia; Vermelho de fenol; Álcool a 95°.
Água peptonada	Peptona de caseína (bovina).
Mueller Hinton (Biomérieux)	Peptona de caseína (bovina); Extracto de carne (bovina ou porcina); Fécula de batata; Agar; Ião Ca^{++} ; Ião Mg^{++} .
Citrato de Simmons (BD)	Citrato de sódio; Fosfato de amónio dihidrogenado; Fosfato dipotássico; Sulfato de magnésio; Agar; Azul bromotimol.